



Stratégies de développement du copépode calanoïde Mixodiaptomus laciniatus dans un lac de montagne : approche par les biomarqueurs lipidiques et pigmentaires

Aurélie Vera

► To cite this version:

Aurélie Vera. Stratégies de développement du copépode calanoïde Mixodiaptomus laciniatus dans un lac de montagne : approche par les biomarqueurs lipidiques et pigmentaires. Ecologie, Environnement. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2005. Français. NNT : 2005CLF21623 . tel-00684181

HAL Id: tel-00684181

<https://theses.hal.science/tel-00684181>

Submitted on 30 Mar 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
N° D.U. 1623

Année 2005

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
N° d'ordre : 428

THESE

Présentée à l'Université Blaise Pascal
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(SPECIALITE : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET DES ECOSYSTEMES)

soutenue le 9 Décembre 2005

par

AURELIE VERA

STRATEGIES DE DEVELOPPEMENT DU COPEPODE CALANOÏDE
MIXODIAPTOMUS LACINIATUS DANS UN LAC DE MONTAGNE :
APPROCHE PAR LES BIOMARQUEURS
LIPIDIQUES ET PIGMENTAIRES

Composition du Jury :

Nicoletta Riccardi (rapporteur)
Jean-François Rontani (rapporteur)
Christian Amblard (président du jury)
Gilles Bourdier (directeur de thèse)
Christian Desvillettes (directeur de thèse)
Benoît Sautour (invité)

Laboratoire de Biologie des Protistes
UMR CNRS 6023 Université Blaise Pascal

Remerciements

Une thèse est un travail de longue haleine. Maintenant que celle-ci s'achève (enfin!), je souhaite remercier les nombreuses personnes qui ont contribué de près ou de loin à cette aventure.

Tout d'abord, je remercie vivement mes deux directeurs de thèse, Gilles Bourdier et Christian Desvillettes, sans qui je n'aurais pu réaliser ce travail. Grâce à eux, j'ai pu garder mon autonomie et ainsi faire un réel apprentissage de la recherche ; ils ont également su me remettre dans le droit chemin quand il le fallait et canaliser mes idées parfois un peu exubérantes.

Je tiens également à remercier Christian Amblard et Gérard Fonty, respectivement Directeur du Laboratoire de Biologie des Protistes et responsable de l'équipe Diversité et fonctionnement des écosystèmes aquatiques, pour leurs encouragements et leurs conseils avisés.

Merci également à Nicoletta Riccardi, Jean-François Rontani et Benoît Sautour, qui ont accepté de juger ce travail et m'ont proposé des suggestions pertinentes concernant le manuscrit.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont directement contribué à ce travail de thèse : Christophe Portelli pour son accompagnement et son aide précieuse lors des sorties sur le terrain qui n'ont pas toujours été une partie de plaisir, et pour avoir accepté de réaliser les prélèvements les plus sportifs qu'il n'ait jamais connu et qu'il ne connaîtra probablement jamais (tube de siphonage à l'utilisation complexe, les 300l litres d'eau à prélever, transporter et filtrer à chaque sortie, des milliers de petits copépodes rouges sauvagement assassinés à chaque fois, etc.) ; Denis Sargos pour les comptages de ciliés et son aide concernant les petits problèmes d'informatique que j'ai pu rencontrer tout au long de ma thèse ; les deux Jean-Claude (Romagoux et Demeure) pour les comptages, les cultures, et le transport des multiples bouteilles de gaz que j'ai pu utiliser ; Jean-Pierre Aguer pour la mise au point du protocole d'analyse des pigments ainsi que pour sa disponibilité et son soutien concernant les nombreux problèmes d'HPLC que j'ai rencontré.

Mes pensées vont également vers les étudiants de l'équipe "Hydrobio" du Laboratoire de Biologie des Protistes : Yvan (entre autres pour nos parties endiablées de flipper entre 12 et 14H et nos petites virées dans les resto "gastronomiques" de Clermont), Aurélie 2 et Anne-Cat pour nos pétages de plombs quotidiens, Marie L. et la grande Cécile pour nos parties de rigolade et nos soirées concours de noyaux de cerise - barbecue, Anne-Hélène, Charles et Manu pour leur bonne humeur continuelle, mais aussi Delphine (plein de bonheur pour le p'tit gars à venir), Ludwig, Emilie, Guillaume, les baby-sitter de l'automne 2005 (Annie, Nathalie, Marie, Nicole, Fred, Corinne), ainsi que les autres membres du laboratoire.

Un grand merci également à ma famille qui m'a toujours soutenu et encouragé sans vraiment comprendre pourquoi je m'intéressais autant à ces petits bestioles rouges qui vivent dans un petit lac perdu au bout de monde.

Enfin, merci à Alex, mon troisième directeur de thèse non officiel, pour sa patience sans limite (et il en a fallu!) et son soutien dans les moments difficiles, ses (nombreux) conseils concernant les sorties sur le terrain, les expériences de nutrition, la biochimie, les cultures, la rédaction du manuscrit, etc... Mes pensées vont aussi vers Manon, qui, avant même sa naissance, m'a permis de dédramatiser les petits tracas liés à la rédaction du manuscrit et à la préparation de la soutenance, et qui a rendu cette difficile phase de la thèse plus joyeuse.

ABREVIATIONS

Ad. : Stade adulte
AG : Acide gras
AGS : Acide gras saturé
AGR : Acide gras ramifié
AGMI : Acide gras monoinsaturé
AGPI : Acide gras polyinsaturé
AGT : Acides gras totaux
C : Carbone
CI à CV : Stade copépodite I à V
CCM : Chromatographie sur couche mince
CE : Cérède
Chl : Chlorophylle
COD : Carbone organique dissous
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
CPG-SM : Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
DDL : Détection par diffusion de lumière
DIF : Détection par ionisation de flamme
DG : Diglycéride
EMAG : Ester méthylique d'acide gras
ES : Ester de stérol
GL : Glycérides
HNF : Nanoflagellés hétérotrophes
HPLC : High performance liquid chromatography
LT : Lipides totaux
MES : Matières en suspension
MG : Monoglycéride
MO : Matière organique
MOD : Matière organique dissoute
MOP : Matière organique particulaire
N : Azote
NI à NVI : stade nauplius I à VI
P : Phosphore
PL : Phospholipide
ST : Stérol
TG : Triglycéride
UV : Ultraviolet
16 PI : Ensemble des AGPI à 16 atomes de carbone

ABREVIATIONS

SOMMAIRE	3
-----------------	----------

INTRODUCTION GENERALE	12
------------------------------	-----------

<u>CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	16
---	-----------

<u>I. Les réseaux trophiques planctoniques des lacs de montagne</u>	16
--	-----------

1. Structure et fonctionnement des réseaux trophiques microbiens	16
---	-----------

2. Les copépodes calanoïdes dans les écosystèmes lacustres de montagne	23
---	-----------

<u>II. Utilisation des lipides et des pigments en tant que marqueurs des relations trophiques planctoniques</u>	25
--	-----------

1. Les marqueurs lipidiques	25
------------------------------------	-----------

<u>a. Définitions – rôles – structures</u>	25
--	----

<u>b. Nomenclature des acides gras</u>	29
--	----

<u>c. Nomenclature des alcools gras</u>	30
---	----

<u>d. Nomenclature des stérols</u>	32
------------------------------------	----

2. Les marqueurs pigmentaires	35
--------------------------------------	-----------

<u>a. Les chlorophylles</u>	35
-----------------------------	----

<u>b. Les phéopigments</u>	35
----------------------------	----

<u>c. Les caroténoïdes</u>	37
----------------------------	----

3. Marqueurs chémotaxonomiques	39
---------------------------------------	-----------

<u>a. La MOP détritique</u>	39
-----------------------------	----

<u>b. Les bactéries hétérotrophes</u>	39
---------------------------------------	----

c. <u>Les protozoaires</u>	40
d. <u>Le phytoplancton</u>	41
e. <u>Les crustacés zooplanctoniques</u>	47
4. Indicateurs de transfert trophique	47
5. Limites de l'utilisation des biomarqueurs	51
a. <u>Pour l'estimation de la biomasse microbienne</u>	51
b. <u>Pour visualiser les relations trophiques</u>	51
6. Rôle et métabolisme des lipides chez les copépodes calanoïdes	52
<u>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES</u>	55
<u>I. Protocole d'échantillonnage en milieu naturel</u>	55
<u>A. Paramètres abiotiques et biotiques classiques</u>	55
1. Température et transparence de l'eau	55
2. Eléments minéraux	55
4. Chlorophylle <i>a</i>	57
<u>B. Matière organique particulaire (MOP)</u>	57
1. Prélèvement	57
2. Fractionnement en classes de taille	57
3. Dénombrements et estimation des biomasses	58
a. <u>Picoplancton autotrophe et bactéries hétérotrophes</u>	58
b. <u>Flagellés</u>	59
c. <u>Ciliés</u>	59

<u>d. Microalgues</u>	60
<u>e. Détermination des compositions taxonomiques des différentes classes de taille</u>	60
4. Préparation et conditionnement des échantillons destinés aux analyses lipidiques et pigmentaires	60
 <u>C. Zooplancton</u>	61
1. Prélèvement	61
2. Dénombrement et identification des espèces zooplanctoniques	61
3. Préparation et conditionnement des échantillons destinés aux analyses lipidiques et pigmentaires	62
<u>a. Conditionnement</u>	62
<u>b. Tri des organismes pour les analyses</u>	62
 <u>II. Etude expérimentale du régime alimentaire de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i></u>	63
1. Choix des sources de nourriture	63
2. Culture et élevage des organismes	64
<u>a. <i>Mixodiaptomus laciniatus</i></u>	64
<u>b. Sources de nourriture</u>	64
3. Déroulement des expériences de nutrition	64
 <u>III. Analyses lipidiques et pigmentaires</u>	65
<u>A. MOP</u>	66
1. Analyses lipidiques	66
<u>a. Extraction des lipides totaux</u>	66

<u>b. Saponification, séparation des AG et des ST, et méthylation des AG</u>	66
<u>c. Séparation et identification des esters méthyliques d'AG (EMAG)</u> <u>par chromatographie en phase gazeuse (CPG)</u>	69
<u>d. Sylilation des ST</u>	72
<u>e. Séparation et identification des ST par CPG</u>	72
2. Analyses des compositions pigmentaires	76
<u>a. Extraction des pigments</u>	76
<u>b. Appareillage</u>	76
<u>c. Conditions opératoires</u>	77
<u>d. Détection et identification</u>	77
<u>e. Quantification</u>	78
 <u>B. Zooplancton</u>	 80
1. Composition des différentes classes de lipides	80
<u>a. Extraction des lipides totaux</u>	80
<u>b. Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche</u> <u>mince (CCM)</u>	80
<u>c. Analyse des AG des PL et des GL</u>	81
<u>d. Analyse des AG des cérides</u>	83
<u>e. Analyse des ST</u>	85
2. Compositions lipidiques	86
<u>a. Extraction des lipides totaux</u>	86
<u>b. Appareillage</u>	86
<u>c. Conditions opératoires</u>	86
<u>d. Détection et identification</u>	87

<u>e. Quantification</u>	87
3. Compositions pigmentaires	89
<u>CHAPITRE III : CONTEXTE DE L'ETUDE</u>	90
<u>I. Description du site d'étude</u>	90
<u>II. Paramètres physico-chimiques</u>	90
1. Température	90
2. Transparence de l'eau	92
3. Chlorophylle <i>a</i>	92
4. Sels nutritifs	92
<u>III. Dynamique des populations zooplanctoniques</u>	95
<u>IV. <i>Mixodiaptomus laciniatus</i></u>	97
1. Cycle biologique	97
2. Reproduction	100
<u>V. Discussion</u>	100

<u>CHAPITRE IV : ENVIRONNEMENT TROPHIQUE</u>	104
<u>I. Composition taxonomique de la MOP [0,7-100]</u>	104
1. Composition taxonomique de la MOP [0,7-100]	104
<u>a. Microalgues phytoplanctoniques</u>	104
<u>b. Picoplancton eucaryote autotrophe</u>	105
<u>c. Picocyanobactéries</u>	107
<u>d. Bactéries hétérotrophes</u>	107
<u>e. Ciliés</u>	107
<u>f. Nanoflagellés hétérotrophes (HNF)</u>	107
2. Dynamique des communautés microbiennes	108
3. Conclusion	109
<u>II. Relations biomarqueurs – biomasse microbienne</u>	111
1. Biomasse et composition taxonomique des différentes classes de taille	111
<u>a. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [30-100]</u>	111
<u>b. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [5-30]</u>	115
<u>c. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [0,7-5]</u>	117
<u>d. Conclusion</u>	117
2. Composition en acides gras des différentes classes de taille	119
3. Composition pigmentaire des différentes classes de taille	126
4. Composition en stérols des différentes classes de taille	129
5. Identification des marqueurs chémotaxonomiques	132
<u>a. Bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries</u>	132
<u>b. Dinophycées</u>	136

<u>c. Cryptophycées</u>	138
<u>d. Chrysophycées</u>	141
<u>e. Diatomées</u>	141
<u>f. Chlorophycées</u>	142
 <u>III. Discussion – Conclusion</u>	 149
 <u>CHAPITRE V : MIXODIAPTOMUS LACINIATUS</u>	 157
 <u>I. Etude des relations trophiques microorganismes – <i>M. laciniatus</i> en conditions expérimentales et en milieu naturel</u>	 157
<u>A. Analyses pigmentaires</u>	157
1. Expériences de nutrition	157
<u>a. Objectifs de l'expérience de nutrition</u>	157
<u>b. Nutrition avec des cultures monospécifiques d'algues ou de picocyanobactéries</u>	159
<u>c. Expériences de nutrition réalisées avec un mélange <i>Synechococcus</i> – microalgue</u>	163
<u>d. Expériences de nutrition réalisées avec un mélange de deux microalgues</u>	165
<u>e. Conclusion</u>	170
2. Etude en milieu naturel	173
<u>a. Contenu digestif en pigments marqueurs des adultes de la première génération</u>	173

<u>b. Contenu digestif en pigments marqueurs des copépodes de la deuxième génération</u>	177
3. Conclusion	179
 <u>B. Acides gras</u>	182
1. Composition en AG des GL extraits de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i> de la deuxième génération	182
2. Composition en AG des CE extraits de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i> de la deuxième génération	185
3. Composition en AG des PL extraits de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i> de la deuxième génération	187
4. Importance des procaryotes et des eucaryotes bactérivores dans le régime alimentaire de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i>	189
5. Identification des principales sources d'AGPI (n-3) pour la deuxième génération de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i>	191
6. Conclusion	194
 <u>C. Stérols</u>	195
 <u>D. Conclusion</u>	198
 <u>II. Métabolisme lipidique de <i>Mixodiaptomus laciniatus</i></u>	203
<u>A. Métabolisme lipidique et reproduction</u>	203
1. Composition lipidique des femelles reproductrices	203
<u>a. Teneurs en lipides totaux et des différentes classes de lipides</u>	203

<u>b. Conclusion</u>	206
2. Composition lipidique des mâles reproducteurs	208
<u>a. Teneurs en lipides totaux et des différentes classes de lipides</u>	208
<u>b. Conclusion</u>	210
3. Conclusion	210
<u>B. Métabolisme lipidique et développement larvaire</u>	212
1. Teneurs en lipides totaux et des différentes classes de lipides	212
2. Conclusion	214
<u>III. Conclusion</u>	215
<u>CHAPITRE VI : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	217
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	227
ANNEXES	270

INTRODUCTION GENERALE

Le copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus* est une espèce sténotherme d'eau froide qui, au Sud de l'Europe, se rencontre fréquemment dans les petits lacs de montagne très oligotrophes (Jersabek et al., 2001). Dans la plupart de ces écosystèmes, il représente plus de 80% de la communauté des microcrustacés zooplanctoniques en terme d'abondance, et réalise un cycle biologique généralement univoltin (Rey & Capblancq, 1975 ; Carrillo et al., 2001 ; Villar-Argaiz et al., 2002). Un tel cycle de vie est cependant peu fréquent chez les copépodes, il se rencontre plutôt chez les calanoïdes vivant dans les lacs d'altitude ou dans les mers polaires (Rey & Capblancq, 1975 ; Albers et al., 1996). Ces milieux contraignants sont caractérisés par des températures basses une grande partie de l'année associées à une période de bloom phytoplanctonique très courte. Face à de telles conditions, les calanoïdes produisent une unique génération par an et les derniers stades copépodites passent généralement la saison hivernale à l'état actif (Kattner & Hagen, 1995). Une telle stratégie nécessite de la part de ces microcrustacés l'accumulation de quantités très importantes de réserves énergétiques (Sargent & Falk-Petersen, 1988). Celles-ci sont essentiellement constituées de lipides, majoritairement sous la forme de triglycérides (TG) et de cérides (CE) (Sargent & Falk-Petersen, 1988 ; Kattner & Hagen, 1995). Ces lipides assurent la survie de la population pendant l'hiver et soutiennent les mécanismes physiologiques liés à la reproduction, notamment la vitellogénèse et la gamétogénèse (Gatten et al., 1980 ; Kattner & Krause, 1987 ; Tande & Henderson, 1988). De nombreuses études ont été consacrées aux processus d'accumulation des réserves lipidiques chez les calanoïdes polaires et ont montré que, chez certaines espèces, les lipides peuvent représenter jusqu'à 70% du poids sec individuel (Albers et al., 1996). De manière analogue, il semblerait que quelques calanoïdes lacustres soient capables de stocker des quantités aussi importantes de lipides (Arts et al., 1993 ; Vanderploeg et al., 1998). Cependant, relativement peu de travaux ont été réalisés en eau douce, malgré le rôle prépondérant des copépodes calanoïdes dans les réseaux trophiques lacustres, en particulier

dans les écosystèmes de montagne très oligotrophes (Halsbend-Lenk et al., 2001). En effet, par leur présence permanente dans ces milieux, ils constituent la principale source de nourriture pour de nombreuses larves et adultes de poissons (Schnack & Böttger, 1981 ; Papst & Hopki, 1984 ; Lévillé, 1997). Ils influencent également la dynamique des communautés microbiennes car ils sont capables de se nourrir sur une large gamme de particules (détritus, bactéries, microalgues, protozoaires, zooplancton, etc...) et stimulent les productions bactérienne et algale par "sloppy feeding" et excrétion (Poulet, 1983 ; Lair & Hilal, 1992 ; Ederington et al., 1995 ; Quiblier-Llobéras, 1994 ; Reche et al., 1997 ; Burns & Schallenberg, 1998 ; Hansen et al., 2000 ; Campbell et al., 2000).

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ce travail sont, d'une part, d'étudier la stratégie d'accumulation des lipides de réserve chez une population naturelle de *Mixodiaptomus laciniatus* caractéristique d'un lac de montagne du Massif Central français, et, d'autre part, de déterminer le rôle de ce calanoïde sur la dynamique des communautés microbiennes de cet écosystème. Pour cela, il s'est avéré primordial de caractériser préalablement le régime alimentaire des différents stades de développement du copépode. La démarche que nous avons par conséquent choisie de mettre en œuvre repose sur l'étude du transfert de marqueurs chémotaxonomiques lipidiques et pigmentaires entre les composantes de la biomasse microbienne et les différentes écophases de *Mixodiaptomus*. Cette démarche a été volontairement conduite en conditions expérimentales et *in situ*.

Organisation du mémoire de thèse

Le premier chapitre de ce manuscrit exposera le contexte bibliographique au sein duquel s'inscrit cette étude. Ainsi, le fonctionnement des réseaux trophiques planctoniques des lacs de montagne et la place des copépodes calanoïdes au sein de ces écosystèmes y seront abordés. Egalement, l'intérêt d'utiliser les marqueurs chémotaxonomiques de type pigments, acides

gras (AG) ou stérols (ST) pour l'étude des relations trophiques s'établissant entre les communautés microbiennes et les microcrustacés zooplanctoniques sera rappelé.

Le second chapitre présentera les différentes méthodes de prélèvement et d'analyse utilisées lors de nos études.

Le chapitre III est dédié à la présentation du site d'étude (lac de La Godivelle-d'en-Haut) ainsi qu'aux principaux paramètres physico-chimiques nous permettant de caractériser ce milieu.

La composition de la communauté zooplanctonique et le cycle biologique de *M. laciniatus* seront également décrits.

Le chapitre IV est consacré à l'environnement trophique potentiel de *Mixodiaptomus*. Il cherche, en premier lieu, à mettre en relation les différentes composantes de la communauté microbienne présente dans le milieu avec la composition en pigments, AG et ST de la matière organique particulaire (MOP) fractionnée par classes de taille. La seconde partie de ce chapitre concerne l'identification de marqueurs chémotaxonomiques de type pigments, AG et ST permettant de caractériser les principales composantes de la matière organique particulaire.

Le cinquième chapitre est consacré à la biologie de *Mixodiaptomus laciniatus* et s'articule autour de deux axes principaux. La première partie a pour but de préciser le régime alimentaire du copépode à partir des biomarqueurs pigmentaires et lipidiques identifiés précédemment (chapitre IV). Pour cela, nous avons tout d'abord étudié en conditions expérimentales le comportement alimentaire et la sélectivité nutritionnelle du calanoïde vis-à-vis des principaux groupes phytoplanctoniques présents dans le lac. Nous avons réalisé des expériences de nutrition en apportant la nourriture phytoplanctonique sous forme monospécifique ou en mélange de deux espèces algales, et en suivant le transfert trophique de pigments marqueurs. Parallèlement et par une démarche analogue, nous avons suivi en milieu naturel les relations trophiques s'établissant entre *Mixodiaptomus laciniatus* et les

composantes de la biomasse microbienne présentes dans le lac à partir du transfert des pigments, AG et ST dans la chaîne trophique.

La seconde partie de ce chapitre vise à souligner l'importance des réserves lipidiques dans le déroulement du cycle biologique de *Mixodiaptomus*. Ainsi, l'évolution de la composition lipidique du copépode lors de deux phases-clé de son cycle, à savoir la période de maturation sexuelle et de reproduction, et la croissance larvaire du calanoïde ont été particulièrement étudiées.

Enfin, une conclusion générale et des perspectives seront proposées.

CHAPITRE I :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les réseaux trophiques planctoniques des lacs de montagne

1. Structure et fonctionnement des réseaux trophiques microbiens

Les lacs de montagne sont des pièces d'eau permanentes de faible superficie, situées au sein d'un massif montagneux à partir de 1200m d'altitude. Ils présentent des bassins versants de surface restreinte, avec un couvert végétal peu important, et une fertilisation faible ou nulle (Niederhauser, 1993 ; Mez et al., 1998). Ces écosystèmes sont en conséquence très oligotrophes (Wille et al., 1999). La productivité et le recyclage des nutriments dans les lacs de haute montagne sont largement gouvernés par les facteurs abiotiques notamment les températures basses et l'importante irradiation UV, une longue période hivernale de gel et de neige, une hydrologie fluctuante (Hinder et al., 1999 ; Medina-Sánchez et al., 2004). Enfin, le carbone organique dissous (COD) est présent dans le milieu en faible concentration (Laurion et al., 2000) et il est caractérisé par sa biodisponibilité réduite liée à des phénomènes de photo-réactivité et de photo-altération (Benner & Biddanda, 1998 ; Reche et al., 2001). Le carbone disponible semble donc être le facteur limitant les croissances bactérienne et algale (Medina-Sánchez et al., 2004). En conséquence, la production primaire est peu élevée (Tilzer, 1972) et la biomasse bactérienne présente une faible productivité puisqu'elle dépend intimement du relargage du carbone organique par les organismes photosynthétiques (Vrede, 1996 ; Laybourn-Parry & Walton, 1998).

Dans les lacs oligotrophes, le picoplancton autotrophe est une composante importante des réseaux trophiques microbiens (Fig. I 1) car ces cellules ont un rapport surface / volume élevé, ce qui constitue un avantage pour la diffusion des nutriments (Chishohlm, 1992 ; Stockner et al, 1999). Il constitue ainsi entre 40 et 60% de la biomasse phytoplanctonique (Stockner, 1991). De plus, les conditions de carence en nutriments rencontrées dans ces

écosystèmes font que le phytoplancton est généralement composé de cellules de petite taille (Reynolds, 1984 ; Psenner & Zapf, 1990).

Dans les écosystèmes d'altitude, les importantes irradiations UV ont un effet négatif sur la fixation de carbone (Callieri et al., 2001 ; Carrillo et al., 2002) et sur l'absorption de nutriments dissous par les producteurs primaires (Hessen et al., 1995 ; Döhler, 1997). Elles provoquent donc une photoinhibition des picocyanobactéries (Fig. I 2) dans les lacs aux eaux claires (Bertoni & Callieri, 1999) ; les eaux chargées de particules en suspension (MES originaires des glaciers par exemple) permettent le développement des picocyanobactéries car les MES empêchent la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau (Hinder et al., 1999).

Concernant l'importance de la boucle microbienne et des bactéries hétérotrophes, plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse que celle-ci était supérieure dans les milieux oligotrophes, non seulement en terme de biomasse, mais aussi en terme de flux de carbone (Fig. I 1) (Straškrabová et al., 1999). On considère aussi traditionnellement que certains facteurs biotiques tels que les interactions positives ou compétitives entre les algues et les bactéries, ou encore la prédation par les protistes hétérotrophes bactérovores sont responsables de la structure et de la succession saisonnière des bactéries dans les milieux aquatiques (Bratbak & Thingstad, 1985 ; Thingstad et al., 1997 ; Pedrós-Alió et al., 2000). La compétition directe entre les algues et les bactéries pour les ressources nutritives constitue alors une interaction importante du fonctionnement de ces écosystèmes limités en nutriments (Currie, 1990 ; Thingstad et al., 1993). Il est cependant reconnu que les nanoflagellés hétérotrophes (HNF), les ciliés et les flagellés mixotrophes, à travers la bactérivorie, modulent la compétition entre les algues et les bactéries (Rothhaupt, 1992 ; Nygaard & Tobiesen, 1993 ; Thingstad & Rassoulzadegan, 1995).

A la différence des lacs oligotrophes tempérés, l'activité bactérienne des lacs de montagne est contrôlée par la température, mais il a été montré que leur métabolisme cellulaire est

comparable à celui des bactéries des lacs de plaine méso- à eutrophes (Straškrabová & Šimek, 1993). Comme la production primaire et les apports allochtones de COD sont faibles dans ces milieux, l'excrétion phytoplanctonique pourrait être une source importante de substrats pour les bactéries (Reche et al., 1996).

Enfin, de nombreuses études ont relaté la prédominance des algues mixotrophes dans les lacs de haute montagne (Fig. I 2) (Straškrabová et al., 1999) ; elles sont le plus souvent représentées par les chrysophycées des genres *Dinobryon* et *Chromulina* ainsi que par la dinophycée *Gymnodinium* (Callieri et al., 1999 ; Medina-Sánchez et al., 1999). Ces travaux suggèrent que la mixotrophie serait une stratégie avantageuse dans ces écosystèmes malgré son coût énergétique qui est supérieur à celui des métabolismes strictement auto- ou hétérotrophes (Rothhaupt, 1996 ; Raven, 1997). En effet, le bénéfice de ce type de stratégie est l'acquisition de carbone organique et de nutriments minéraux à partir des proies ingérées (Caron et al., 1993 ; Raven, 1997). Du fait que les valeurs des rapports C/N et C/P des proies, principalement des bactéries, sont généralement inférieures à celles des organismes phagotrophes photosynthétiques, celles-ci constituent de bonnes sources de nutriments pour les mixotrophes en condition d'oligotrophie (Caron et al., 1993). Cette stratégie a aussi un effet compensatoire pour les organismes mixotrophes car, en ingérant des bactéries, ils éliminent ainsi leurs principaux compétiteurs pour les ressources nutritives (Thingstad et al., 1996). Lorsque la lumière est le principal facteur limitant la croissance algale, les différences entre les rapports C/N et C/P des bactéries et des mixotrophes peuvent conduire à un excès de nutriments chez ces derniers qui les relarguent alors dans le milieu sous forme dissoute (Rothhaupt, 1997). La capacité d'obtenir les éléments minéraux et le carbone organique via la phagotrophie permettrait par conséquent aux mixotrophes de dominer le phytoplancton dans ces écosystèmes. Ainsi, les mixotrophes remplaceraient les autotrophes obligatoires, moins compétitifs face à une limitation du milieu en nutriments (Rothhaupt, 1996 ; Christaki et al.,

1999) ; ils occuperaient la niche écologique des organismes microhétérotrophes (protozoaires ciliés et flagellés) qui sont généralement peu abondants dans ces écosystèmes (Sattler, 1998), conduisant ainsi à une simplification de la structure du réseau trophique. Cependant, les organismes mixotrophes, à cause du coût métabolique important engendré par cette stratégie, ont des taux de croissance inférieurs à ceux des organismes autotrophes obligatoires. Ceci a pour conséquence la coexistence et la compétition des deux types d'organismes (Fig. I 2), en fonction des conditions de limitation en nutriments du milieu (Rothhaupt, 1996). Ainsi, Carrillo et al. (1995, 1996b), Villar-Argaiz et al. (2002) et Medina-Sánchez et al. (2004) ont observé que dans un lac de haute montagne espagnol, les autotrophes obligatoires se développent lorsque la disponibilité en phosphore du milieu augmente par resuspension des sédiments, apports allochtones ou recyclage par le zooplancton, tandis que les mixotrophes dominent la communauté phytoplanctonique le reste du temps.

L'abondance et la composition du métazooplancton est une autre source de biodiversité des communautés microbiennes lacustres en raison de sa nutrition sélective sur celles-ci (Porter, 1977). La nutrition du zooplancton sur les algues phytoplanctoniques a deux effets contradictoires : elle diminue l'abondance de certaines espèces par prédation (Elser & Goldman, 1991 ; Carrillo et al., 1995) et elle augmente la disponibilité des ressources nutritives pour les algues par "sloppy feeding" et excrétion (Sterner, 1990 ; Peduzzi & Herndl, 1992 ; Sterner et al., 1995 ; Carrillo et al., 1996a). L'intensité de ces deux effets dépend du statut trophique de l'écosystème. En milieu oligotrophe, la consommation des algues semble constituer l'effet dominant, d'autant que le faible impact de prédation par les poissons zooplanctonophages permet au zooplancton de grande taille de se développer (Taylor, 1984). A l'inverse, dans les lacs eutrophes où la pression de prédation du zooplancton par les poissons est importante, l'effet positif pour le développement du phytoplancton est supérieur. L'ensemble de ces effets agit sur la succession saisonnière du phytoplancton. Dans les lacs

oligotrophes, les taux de croissance des microalgues phytoplanctoniques sont facilement égalés ou surpassés par le taux de broutage du zooplancton de grande taille (Gliwicz, 1969, 1985). En conséquence, la communauté phytoplanctonique décline après le pic printanier, au moment où le zooplancton est présent en densité importante dans le milieu (McQueen et al., 1986 ; Sommer et al., 1986 ; Dawidowicz & Gliwicz, 1987). Plusieurs études ont également pu montrer que le "sloppy feeding" pouvait jouer un rôle très important sur les communautés microbiennes lacustres. Ainsi, Møller et al. (2003) ont observé, par marquage du phytoplancton au ^{14}C , que la moitié du carbone ingéré par *Calanus* était relâché par ce copépode sous forme de COD. De la même manière, des expériences menées en mésocosmes avec des diatomées et *Acartia tonsa* (Roman et al., 1988) suggèrent que la présence des copépodes conduit à une meilleure efficacité du recyclage des nutriments ainsi qu'à la stimulation de la production bactérienne.

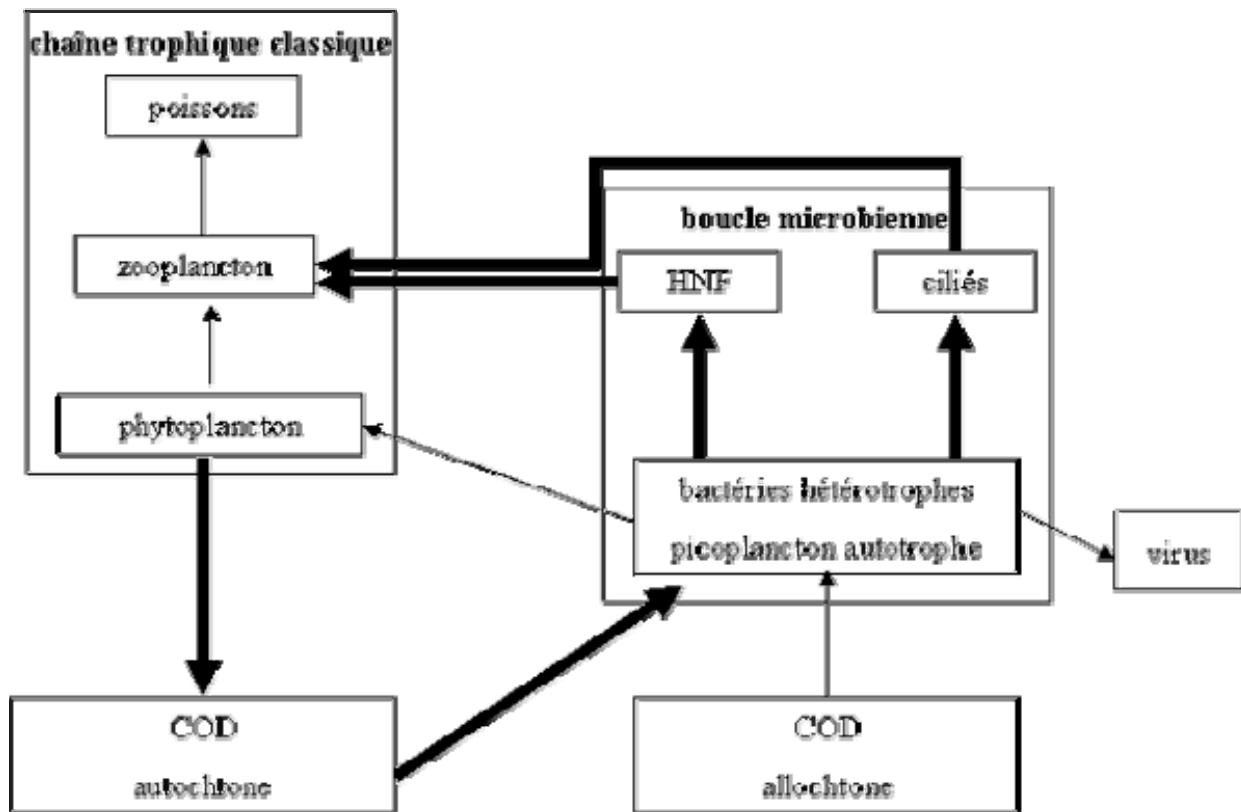


Figure I 1 : Schéma des flux de carbone au sein du réseau trophique planctonique d'un lac oligotrophe tempéré (modifié d'après Medina-Sánchez et al., 2004).

L'épaisseur des flèches représente l'importance relative des flux de carbone.

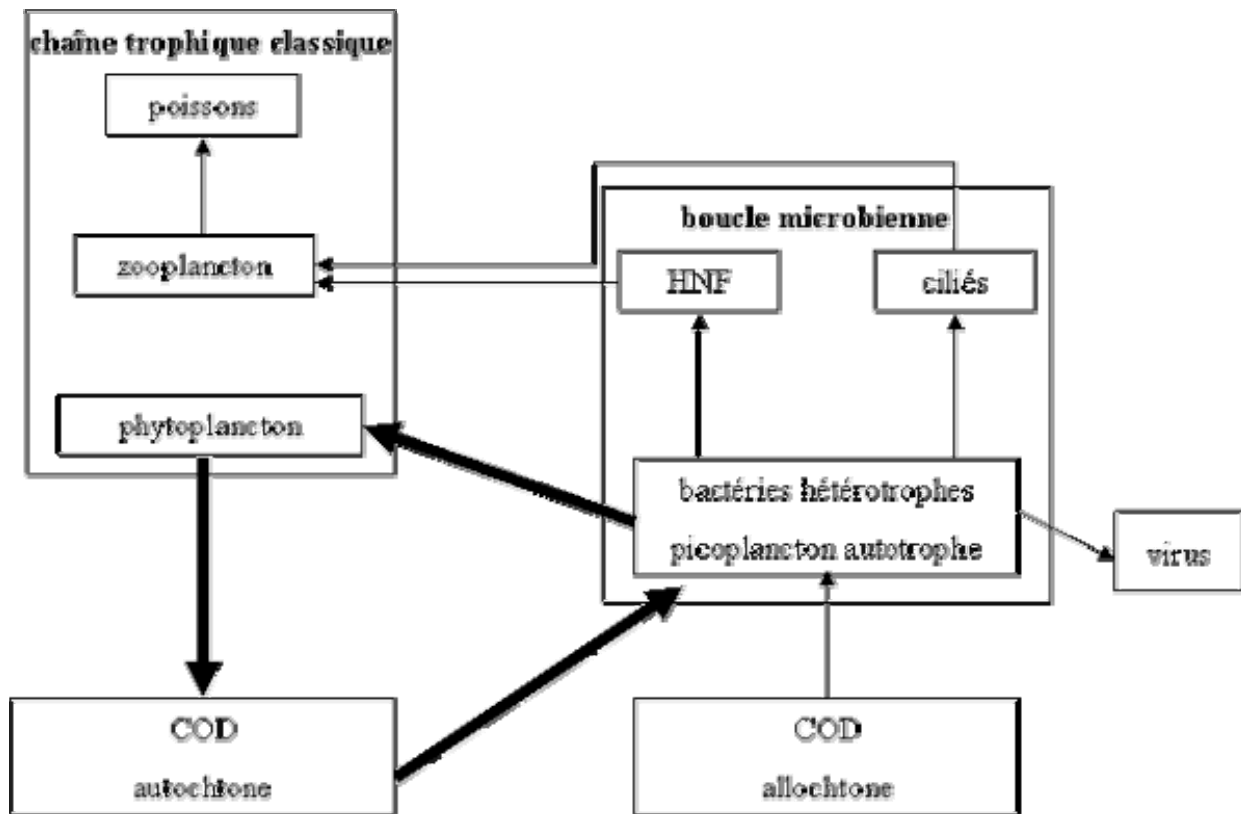


Figure I 2 : Schéma des flux de carbone au sein du réseau trophique planctonique d'un lac de montagne oligotrophe (modifié d'après Medina-Sánchez et al., 2004).

L'épaisseur des flèches représente l'importance relative des flux de carbone.

2. Les copépodes calanoïdes dans les écosystèmes lacustres de montagne

Dans ces milieux d'altitude, les communautés zooplanctoniques sont généralement simplifiées par rapport aux lacs plus tempérés à cause des conditions environnementales extrêmes de ces écosystèmes (Pechlaner 1971 ; Tilzer & Schwartz, 1976 ; Capblancq & Laville, 1983). Ainsi, la structure du réseau trophique planctonique, la morphologie et le statut trophique du lac conditionnent la présence d'organismes zooplanctoniques de grande taille tels que les copépodes calanoïdes (*Diaptomus*, *Acanthodiaptomus*, *Mixodiaptomus*, etc.) et cyclopoïdes (*Cyclops*) ainsi que les grands cladocères (*Daphnia*). (Winder et al., 2003) ; elles ne permettent le développement que d'un nombre restreint d'espèces de microcrustacés (Rey & Capblancq, 1975 ; Cruz-Pizarro, 1983). Les conditions thermiques et nutritives contraignantes rencontrées dans ces milieux de montagne font que les cladocères et les cyclopoïdes ne sont généralement présents qu'en saison printanière et estivale ; en raison de leur fréquente dominance au sein de ces écosystèmes et de leur présence permanente et continue dans le milieu (Reche et al., 1997), la plupart des études menées dans les lacs de montagne ont concerné les copépodes calanoïdes. Ces derniers constituent des proies préférentielles pour les poissons zooplanctonophages (Papst & Hopki, 1984 ; Schnack & Böttger, 1981 ; Léveillé, 1997) et jouent également un rôle important dans la structuration et la dynamique des réseaux trophiques planctoniques. En effet, ils sélectionnent leur nourriture, mais aussi libèrent dans le milieu de la matière organique (MO) et des minéraux à la fois par "sloppy feeding" et par excrétion qui seront ensuite utilisés par les bactéries et les microalgues. Etant donné les différences importantes entre les premiers stades larvaires (nauplius) et les adultes de copépodes, leur cycle biologique et la biologie de leur reproduction jouent un rôle clé dans la succession saisonnière des microorganismes, et déterminent par conséquent la structuration de l'ensemble du réseau trophique planctonique (Halsband-Lenk et al., 2001).

Il est admis que la reproduction des copépodes est affectée par la température et la disponibilité en nourriture (Dagg, 1978 ; Landry, 1978 ; Uye, 1981 ; Abou Debs & Nival, 1983 ; Smith & Lane, 1985 ; Huntley & Lopez, 1992 ; Hirche et al., 1997 ; Saiz et al., 1999). Beaucoup d'études se sont concentrées sur les effets de ces deux facteurs sur la reproduction et le cycle biologique des copépodes, mais il apparaît que d'autres paramètres doivent être pris en compte ; c'est le cas par exemple de leur passé nutritionnel (Båmstedt & Tande, 1988 ; Huntley, 1988 ; Hirche, 1992), de l'âge des femelles (Rey et al., 1999), des réserves énergétiques accumulées avant la reproduction (Rey et al., 1999), ou encore de la qualité de la nourriture ingérée par les copépodes (Kleppel et al., 1998a ; Gasparini et al., 1999). De plus, ces organismes ont longtemps été considérés comme des filtreurs passifs ayant un régime alimentaire strictement herbivore. Or, selon Pont (1995), ils seraient capables de réaliser simultanément une filtration sélective des particules de grande taille et une filtration passive des particules de petite taille (quelques microns), ou encore d'éviter ou de rejeter certaines particules. On considère aussi que leur régime alimentaire est plutôt à tendance omnivore, voire parfois carnivore. Ainsi, ils pourraient s'alimenter sur de nombreuses sources de nourriture potentielles telles que la matière organique dissoute (MOD) (Poulet, 1983), les protozoaires (Ederington et al., 1995 ; Reche et al., 1997 ; Burns & Schallenberg, 1998), les microalgues (Quiblier-Llobéras, 1994 ; Hansen et al., 2000), les rotifères (Lair & Hilal, 1992), les nauplii de copépodes (Vanderploeg et al., 1998), les bactéries (Reche, 1995) ou encore les particules détritiques (Campbell et al., 2000). Toutefois, le régime alimentaire des copépodes est variable selon l'espèce considérée (Tackx et al., 1990) et, au sein d'une même espèce, selon le stade de développement, le sexe et la saison (Landry, 1983 ; Dexter, 1986 ; Green et al., 1992 ; Quiblier-Llobéras et al., 1996a). De plus, d'autres facteurs tels que la composition biochimique (Sykes & Huntley, 1987 ; Cowles et al., 1988 ; DeMott, 1988), la digestibilité, les propriétés gustatives (DeMott, 1988), la toxicité (Hansen & Boeckel, 1991 ; Gasparini et

al., 2000), la forme et la motilité des proies (DeMott & Watson, 1991) peuvent aussi influencer le comportement alimentaire des copépodes.

II. Utilisation des lipides et des pigments en tant que marqueurs des relations trophiques planctoniques

Un biomarqueur est un composé organique stable sur une échelle de temps donnée dont la structure peut être assignée à une origine biologique définie (Mudge & Norris, 1997). Ces composés doivent donc être spécifiques d'un organisme ou d'un groupe d'organismes précis. Depuis un certain nombre d'années, diverses molécules (acides gras, stérols, pigments) ont été utilisées en tant que marqueurs des composantes de la MOP (Bourdier, 1985 ; Mayzaud et al., 1989 ; Volkman et al., 1989 ; Thoumelin et al., 1997 ; Pond et al., 1998 ; Bodineau et al., 1998), de son état de fraîcheur (Reitan et al., 1994 ; Saliot, 1994), de sa valeur nutritionnelle (Claustre et al., 1992 ; Bec et al., 2003a, b), de l'activité biologique (Volkman et al., 1986), des transferts trophiques (Lee et al., 1971b ; Kattner et al., 1989 ; Welschmeyer et al., 1991 ; Desvillettes, 1994 ; Quiblier et al., 1994 ; Quilblier-Llobéras et al., 1996a ; Ederington et al., 1995 ; Beghin, 1999).

1. Les marqueurs lipidiques

a. Définitions – rôles - structures

Les lipides se définissent comme des substances organiques peu ou pas solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants polaires. Le terme de lipides renferme une grande diversité de structures et de fonctions. Christie (1989) les classe en lipides simples et en lipides complexes. On peut également se baser sur les différences de polarité de ces molécules

et considérer alors les lipides neutres (acides gras, stérols libres et esters de stérols, cérides, glycérides) et les lipides polaires (phospholipides, glycolipides, lipoprotéines).

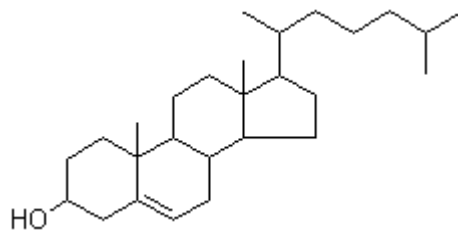
Lipides neutres (Fig. I 3)

- Les **stérols** sont des alcools triterpènes tétracycliques à longue chaîne carbonée dérivés du squalène. La fonction alcool du cycle 1 peut subir une estérification pour former un ester de stérol. Ces composés ne sont présents que chez les organismes eucaryotes.

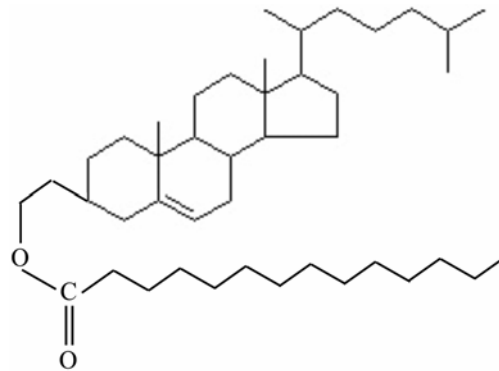
- Les **esters de stérols** (ES) sont des esters d'acides gras et de stérols.

- Les **glycérides** sont formés d'un alcool (le glycérol en général) estérifié à 1, 2 ou 3 acides gras (identiques ou différents). Les plus fréquents sont les triglycérides, qui constituent la principale forme de stockage des lipides chez les animaux et les végétaux. Chez les animaux, ils représentent la principale source d'énergie métabolique en période de jeûne. Les mono- et diglycérides (MG et DG) sont abondants et sont des intermédiaires de la synthèse ou de la dégradation des triglycérides. Les bactéries sont dépourvues de ces trois types de composés.

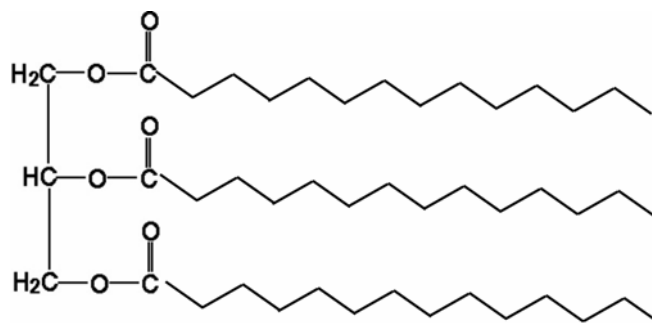
- Les **cires ou cérides** sont des esters d'acides gras et d'alcools aliphatiques à longue chaîne carbonée. En milieu aquatique, ces molécules de stockage sont principalement trouvées chez les copépodes calanoïdes, notamment des mers polaires, chez certains organismes vivant dans les zones océaniques profondes, plus rarement chez le phytoplancton et les bactéries, et en faibles quantités chez certaines dinophycées (Robinson et al., 1987). Elles sont synthétisées dans les membranes plasmiques de certaines cellules (Sargent, 1976).



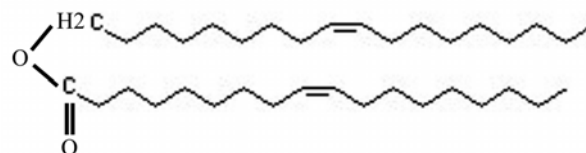
Stérol (cholestérol)



Ester de stérol

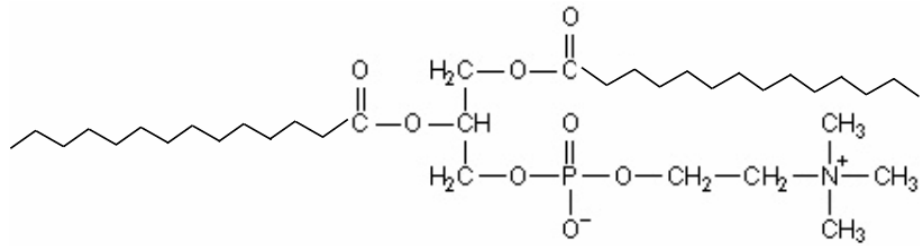


Triglycéride

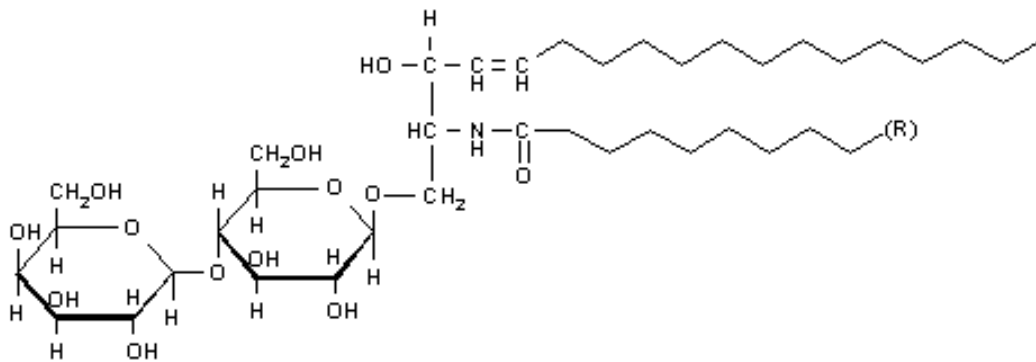


Céride

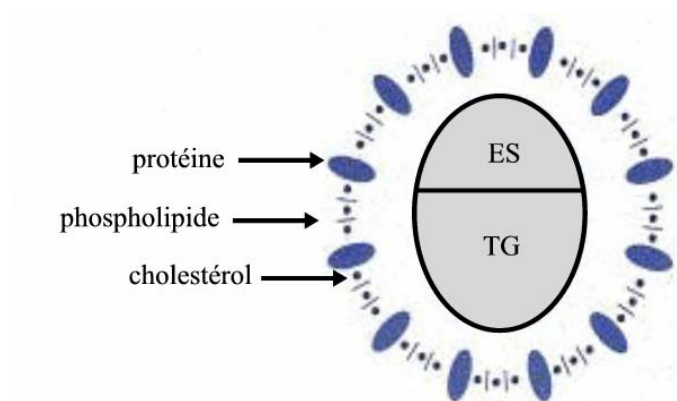
Figure I 3 : Structure des lipides neutres



Phospholipide (phosphatidylcholine)



Glycolipide (galactocérébroside)



Lipoprotéine
(ES : esters de stérols ; TG : triglycérides)

Figure I 4 : Structure des lipides polaires

Lipides polaires (Fig. I 4)

- Les **phospholipides (PL)** sont des esters de glycérol et d'AG dont une fonction alcool est estérifiée par une molécule d'acide phosphorique, elle-même associée à une amine ou à un sucre (inositol). On parle ainsi de phosphatidylsérine, phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol. Ce sont les constituants principaux des membranes cellulaires au sein desquelles ils jouent un rôle structural et fonctionnel important. Ainsi, leur composition en acides gras module la fluidité membranaire et agit par conséquent sur la perméabilité des cellules.

- Les **glycolipides** sont constitués d'esters d'AG et de molécules d'oses ou de dérivés d'oses ; ils sont présents dans les membranes plasmiques et chloroplastiques, dans le tissu nerveux, à la surface des cellules où ils jouent un rôle dans les interactions cellulaires, en tant qu'antigènes et récepteurs de surface de toxines et de virus.

- Les **lipoprotéines** sont composées d'une sphère renfermant des protéines, des PL et du cholestérol, au sein de laquelle sont localisés des TG estérifiés à du cholestérol. Chez les vertébrés et les arthropodes, elles constituent la forme de transport de la plupart des substances lipidiques dans le milieu extracellulaire.

b. Nomenclature des acides gras

Les AG sont les constituants de base de la majorité des lipides. Ce sont des acides carboxyliques dont la chaîne carbonée, linéaire ou ramifiée, peut éventuellement présenter une ou plusieurs insaturations. Ainsi, on distingue (Fig. I 5) :

- Les AG saturés à chaîne linéaire (AGS)

- Les AG saturés à chaîne ramifiée (AGR) : la ramification peut être un groupement méthyl disposé sur l'avant dernier atome de carbone par rapport à la fonction méthyle terminale. Ce méthyle est branché soit en position *iso*, soit en position *anteiso*. Certains AG,

comme l'acide phytanique, peuvent posséder plusieurs ramifications. Certains composés possèdent une fonction cyclopropylique, les plus fréquents ont 17 ou 19 atomes de carbone ($\nabla 17$ et $\nabla 19$).

- Les AG monoinsaturés (AGMI) et polyinsaturés (AGPI) : ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons sur la chaîne carbonée, généralement en position *cis*, plus rarement en position *trans*. Dans le cas où il y a plusieurs insaturations, celles-ci sont habituellement séparées par un groupement méthyle.

Il existe plusieurs nomenclatures pour caractériser les AG.

La nomenclature normalisée par l'IUPAC est la suivante :

$$Ci : p \Delta x$$

Où i : nombre d'atomes de carbone sur la chaîne aliphatique

p : nombre de doubles liaisons

x : positions des doubles liaisons à partir du groupement carboxyle terminal

La nomenclature utilisée en biochimie est la suivante :

$$Ci : p \omega x \text{ ou } Ci : p (n-x)$$

où i : nombre d'atomes de carbone sur la chaîne aliphatique

p : nombre de doubles liaisons

x : position de la première double liaison à partir du groupement méthyle terminal

c. Nomenclature des alcools gras

Ils diffèrent des AG par la présence d'un groupement hydroxyle à la place de la fonction carboxylique. On utilise la même nomenclature que celle définie pour les AG.



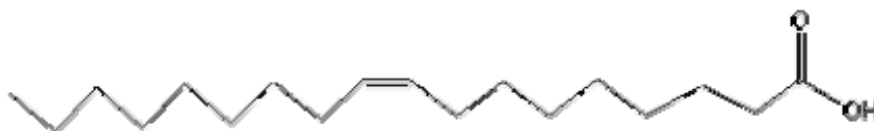
Acide gras saturé : acide stéarique (18:0)



Acide gras ramifié iso 15:0



Acide gras cyclopropylé (∇ 19:0)



Acide gras monoinsaturé : acide oléique (18:1 Δ 9 ou 18:1(n-9) ou 18:1 ω 9)



Acide gras polyinsaturé : acide linoléique (18:2 Δ 9,12 ou 18:2(n-6) ou 18:2 ω 6)



Acide gras polyinsaturé : acide α -linoléique (18:3 Δ 9,12,15 ou 18:3(n-3) ou 18:3 ω 3)

Figure I 5 : Structure moléculaire de divers acides gras

d. Nomenclature des stérols

Les stérols sont dérivés d'un noyau tétracyclique, celui du cyclopentanophénanthrène (Fig. I 6). La majorité des stérols ont des groupements méthyle attachés aux carbones 10 et 13 du noyau tétracyclique ; les atomes de ces groupements sont numérotés 19 et 18 et sont situés au-dessus du plan formé par le noyau tétracyclique (Fig I 6 : trait de valence plein), ils servent de référence pour la conformation de la molécule. Ainsi, les substituants situés, comme les méthyles 18 et 19, au-dessus du plan formé par le noyau tétracyclique, sont en position *cis* ou β (Fig I 6 : trait de valence plein). Les substituants situés en dessous du plan sont dits en position *trans* ou α (Fig I 6 : trait de valence pointillé).

Les stérols ont un nom issu de la nomenclature recommandée par l'IUPAC, la plupart ont aussi un nom générique. Certains auteurs utilisent une abréviation du nom issu de la nomenclature, qui est du type :



où i : nombre total d'atomes de carbone

x : positions des doubles liaisons

Au cours de cette étude, nous avons identifié 11 stérols dont le nom et la structure moléculaire sont donnés dans le tableau I 1.

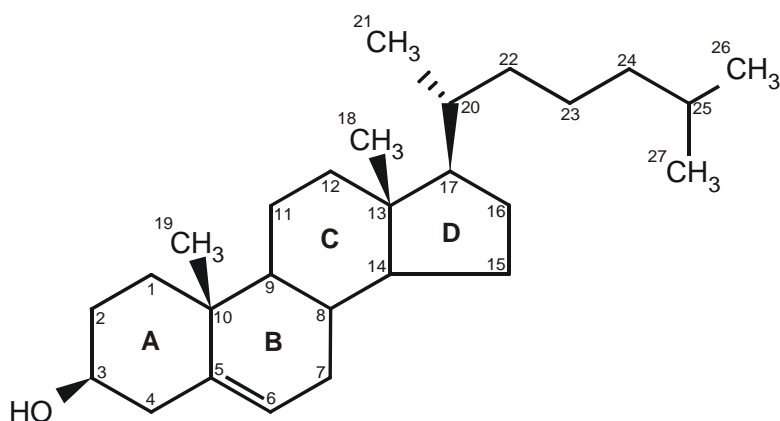


Figure I 6 : Schéma du noyau cyclopentanophénanthrène et numérotation des atomes de carbone pour identifier les stérols (exemple du cholestérol).
Traits de valence pleins : substituants en position β ou *trans* ;
Traits de valence pointillés : substituants en position α ou *cis*.

Nom issu de la nomenclature	Nom générique	Abréviation	Structure moléculaire
24-Norcholesta-5,22-(E)-dien-3 β -ol		$C_{26}\Delta^{5,22}$	
5 α -Cholest-7-en-3 β -ol	Lathostérol	$C_{27}\Delta^7$	
Cholest-5-en-3 β -ol	Cholestérol	$C_{27}\Delta^5$	
Cholesta-5,22-(E)-dien-3 β -ol	22-Dehydrocholestérol	$C_{27}\Delta^{5,22}$	
24-Methylcholes-5-en-3 β -ol	Campestérol	$C_{28}\Delta^5$	
24-Methylcholesta-5,22(E)-dien-3 β -ol	Brassicastérol	$C_{28}\Delta^{5,22}$	
24-Methylcholesta-5,24(28E)-dien-3 β -ol	24-Methylenecholestérol	$C_{28}\Delta^{5,24(28)}$	
24-Ethylcholesta-5,24(28E)-dien-3 β -ol	fucostérol	$C_{29}\Delta^{5,24}$	
24-Methyl-5 α -cholesta-7,24(28)-dien-3 β -ol	Epistérol	$C_{28}\Delta^{7,24}$	
24-Ethylcholest-5-en-3 β -ol	β -sitostérol	$C_{29}\Delta^5$	
24-Ethylcholesta-5,22(E)-dien-3 β -ol	Stigmastérol	$C_{29}\Delta^{5,22}$	

Tableau I 1 : Nom issu de la nomenclature (IUPAC), nom générique, abréviation et structure moléculaire des stérols identifiés au cours de l'étude.

Les traits pleins et pointillés représentent respectivement une orientation au-dessus (β) et en dessous (α) du plan défini par le cycle.

2. Les marqueurs pigmentaires

La plupart des pigments ne sont présents que chez les organismes photosynthétiques. Chez les procaryotes, ils sont localisés dans les membranes des thylakoïdes ; chez les eucaryotes, les pigments sont situés dans les chloroplastes au niveau des membranes des thylakoïdes.

a. Les chlorophylles

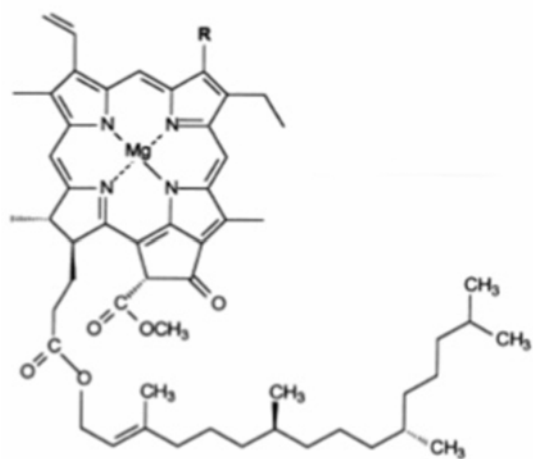
Elles sont prépondérantes dans les chloroplastes et constituent les centres réactionnels des photosystèmes I et II. Elles capturent l'énergie lumineuse avec des maxima d'absorption entre 400 et 500nm et entre 600 et 700nm. Elles sont constituées d'un noyau porphyrinique qui chélate un atome de magnésium Mg^{2+} (Fig. I 7).

b. Les phéopigments

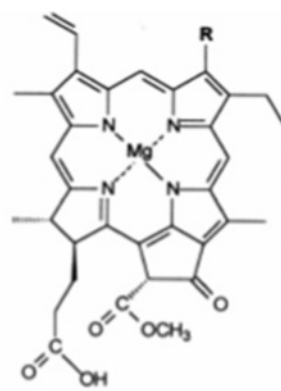
Les phéopigments sont des produits de dégradation des chlorophylles. Leur apparition est favorisée par le broutage, l'activité bactérienne ou la sénescence des cellules algales (Head & Harris, 1994). Lors de la dégradation des chlorophylles, le cycle tétrapyrrolique reste stable et permet la conservation de la fluorescence des phéopigments.

On distingue (Fig. I 7) :

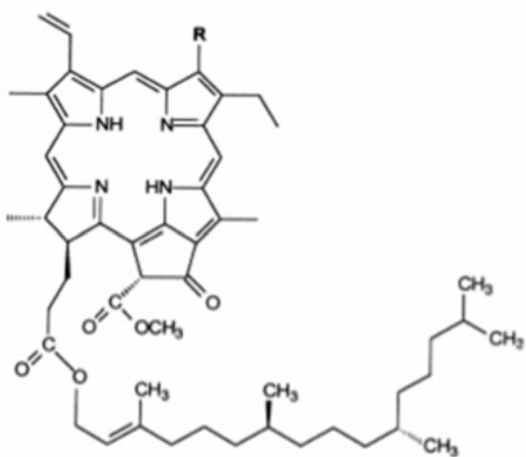
- Les **phéophytines** : L'ion Mg^{2+} est remplacé par 2 atomes d'hydrogène sous l'action de la déchelatase (Owen & Falkowski, 1982).
- Les **chlorophyllides** : La chaîne phytyl est hydrolysée par la chlorophyllase sous certaines conditions (Barrett & Jeffrey, 1964), par exemple lors de la sénescence des algues ou lors du broutage.



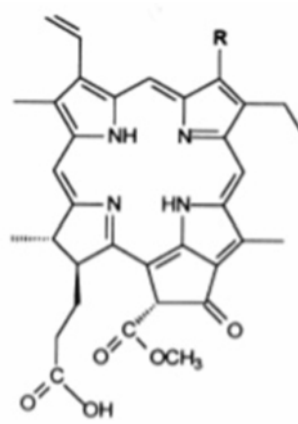
Chlorophylle



Chlorophyllide



Phéophytine



Phéophorbide

Figure I 7 : Structure des chlorophylles *a* et *b* et de leurs produits de dégradation.
 Pour la chlorophylle *a* et ses dérivés, R = -CH₃.
 Pour la chlorophylle *b* et ses dérivés, R = -CHO.

- Les **phéophorbides** sont produites par perte de l'ion Mg^{2+} et de la chaîne phytyl, généralement en milieu acide comme dans le tractus digestif du zooplancton herbivore (Shuman & Lorenzen, 1975 ; Hallegraeff, 1981).

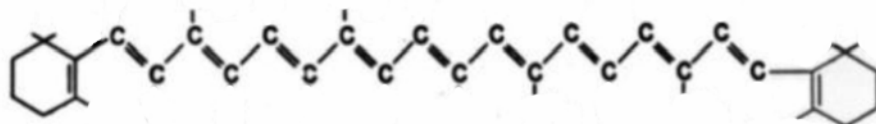
Les phéopigments peuvent parfois servir de précurseurs pour la biosynthèse des chlorophylles. Ils peuvent également être dégradés en produits non fluorescents (pyrophéopigments). Les chlorophylles et les chlorophyllides seraient des récepteurs modulant la biosynthèse des caroténoïdes (Gray, 1987 ; Bramley & Mackenzie, 1988).

c. Les caroténoïdes

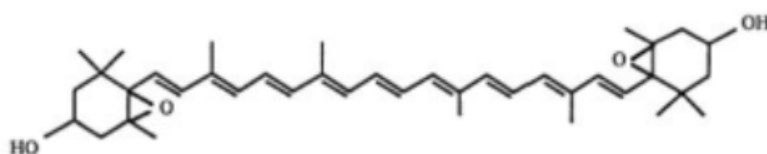
Chez les eucaryotes autotrophes, ils sont localisés dans les chloroplastes ou les chromoplastes. Les caroténoïdes sont qualifiés de pigments accessoires de la photosynthèse ; ils absorbent l'énergie lumineuse à des maxima compris entre 450 et 550nm et la transfèrent aux centres réactionnels. Certains ont un rôle de photoprotection de la photosynthèse, d'autres comme le β -carotène sont des précurseurs de vitamines. Les caroténoïdes intrinsèques au zooplancton (astaxanthine par exemple) sont situés au niveau des gouttelettes lipidiques et des "sacs à huile". Ces molécules sont, contrairement aux chlorophylles, relativement stables et moins sensibles à la dégradation.

On distingue (Fig. I 8) :

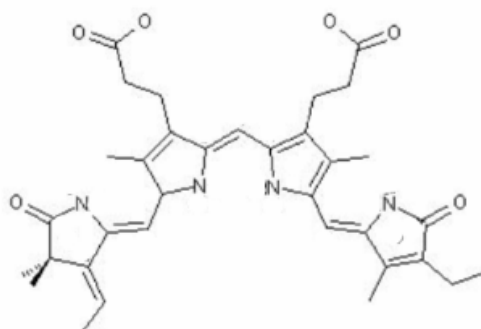
- Les **carotènes**, carbures d'hydrogène à longues chaînes carbonées polyinsaturées. Le plus commun est le β -carotène.
- Les **xanthophylles**, dérivés des carotènes avec une ou plusieurs fonctions cétones.
- Les **phycobilines**, présentes uniquement chez les rhodophycées et les cyanobactéries.



Carotène (β-carotène)



Xanthophylle (violaxanthine)



Phycobiline (phycocyanobiline)

Figure I 8 : Structure des différents types de caroténoïdes

3. Marqueurs chémotaxonomiques

Les pigments, les acides gras et les stérols sont souvent utilisés en tant que marqueurs du phytoplancton (Ackman et al., 1968 ; Chuecas & Riley, 1969 ; Parrish, 1987 ; Goutx, 1988 ; Head & Harris, 1994). Les tableaux I 2, 3, 4 donnent la distribution des principaux pigments, AG et ST respectivement au sein des composantes du plancton.

La présence de certains de ces composés et leur abondance relative permet d'identifier, et parfois de quantifier, les différentes composantes de la MOP présente dans le milieu :

a. La MOP détritique

Elle peut être composée par exemple de détritits d'algues (dérivés de fucoxanthine), d'algues en sénescence (chlorophyllide *a*) ou de débris de végétaux supérieurs (Kleppel et al., 1988 ; Ridout & Morris, 1988). Ceux-ci sont caractérisés par de la chlorophyllide *b* et des AGS à longue chaîne carbonée entre 24 et 32 atomes de carbone (Kolattukudy, 1976) provenant des cires cuticulaires ; ils contiennent aussi du 18 :2(n-6) et du 18 :3(n-3) qui sont rapidement détruits lors de la dégradation des tissus.

b. Les bactéries hétérotrophes

Seules les eubactéries contiennent des AG, les Archæ ont une composition lipidique très différente et caractéristique ; en effet, leurs membranes cellulaires contiennent des lipides formés de ramifications isoprènes et de groupements éthers ; par exemple, les éthers de glycérol sont utilisés en tant que biomarqueurs de ces organismes (Pelmont, 1993).

Les eubactéries sont caractérisées par des AG ramifiés à 15 et 17 atomes de carbone (Perry et al., 1979 ; Volkman et al., 1980b), les AG dominants sont le 15 :0, le 16 :0, le 17 :0 et le 18 :1(n-7) ; elles peuvent aussi synthétiser des AG cyclopropylés en C17 et C19 (Perry et al., 1979). Si l'on excepte certaines bactéries vivant dans les grands fonds océaniques chez qui on

a décelé la présence de 20 :5(n-3) (Henderson et al., 1995), les eubactéries sont généralement incapables de synthétiser des AG de plus de 18 atomes de carbone et des AGPI.

On considère que le rapport 18 :1(n-7) / 18 :1(n-9) est supérieur à 1 chez les bactéries (Claustre, 1987 ; Claustre et al., 1992 ; Saliot, 1994), et inférieur à 1 chez les diatomées, les prymnésiofycées et les algues vertes (Volkman et al., 1989). Claustre et al. (1992) utilisent la somme des AG en C15 et C17 ou le rapport (iso + anteiso) 15 :0/15 :0 pour caractériser les bactéries. Cependant, ces indices seraient spécifiques de certains groupes bactériens (Claustre et al., 1992), et ne permettraient pas de caractériser la totalité de la biomasse bactérienne. D'autres études ont pu distinguer des groupes précis tels que les clostridiées, les bactéries anaérobies, les bactéries gram-positives ou -négatives, ou encore les bactéries sulfato-réductrices à l'aide de un ou plusieurs AG particuliers (Volkman & Johns, 1977 ; Parkes & Taylor, 1983 ; Findlay & Dobbs, 1993 ; Changrui & Hollander, 1997 ; Langworthy et al., 1998).

Enfin, les bactéries hétérotrophes, comme tous les organismes procaryotes, sont incapables de synthétiser des stérols *de novo*.

c. Les protozoaires

Les protozoaires n'ont généralement pas de compositions en AG caractéristiques ; celles-ci dépendent fortement de la nature de leur alimentation. Ainsi, les protozoaires algivores pourraient contenir préférentiellement des AGPI (n-3) (Claustre et al., 1989) alors que ceux se nourrissant de bactéries hétérotrophes accumuleraient plutôt des AG ramifiés provenant de leur source de nourriture (Ederington et al., 1995 ; Desvilettes et al., 1997a ; Harvey et al., 1997 ; Véra et al., 2001). Toutefois, Sargent et al. (1987), Desvilettes et al. (1997a) et Zhukova & Kharlamenko (1999) ont souligné que les valeurs du rapport AGPI (n-3) / AGPI (n-6) étaient généralement faibles chez ces organismes.

De la même manière, les protozoaires montrent une grande diversité de compositions en stérols, quelques espèces pouvant synthétiser certains de ces composés *de novo*, alors que d'autres doivent obligatoirement les obtenir de leur nourriture (Volkman, 2003). Harvey et al. (1997) ont mis en évidence qu'en l'absence de stérols dans leur source de nourriture, certains ciliés tels que *Pleuronema* et *Paraureonema* synthétisent du tétrahymanol (alcool triterpène) et une grande diversité d'hopanoïdes.

d. Le phytoplancton

Les compositions en pigments, AG et ST des algues d'eau douce sont proches de celles des espèces marines. Ainsi, ces organismes sont caractérisés par de fortes proportions d'AGPI et par un rapport AGPI (n-3) / AGPI (n-6) élevé (Ahlgren et al., 1992).

Les **diatomées** sont caractérisées par la présence de fucoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, chl $c_1 + c_2$ et par de faibles proportions de chl c_3 (Wright & Shearer, 1984 ; Quiblier et al., 1994). La plupart de ces pigments se rencontrant dans d'autres classes d'algues, la présence simultanée de fucoxanthine et de diadinoxanthine est généralement utilisée pour caractériser les diatomées (Andersen et al., 1996).

Leur composition en AG montre de fortes proportions en 20 :5(n-3) et en 16:1(n-7) (Sicko-Goad et al., 1988) ainsi que la présence d'AGPI à 16 atomes de carbone (16 :2(n-4), 16 :2(n-7), 16 :3(n-4), 16 :4(n-1)) qui sont des marqueurs chémotaxonomiques de ce groupe phytoplanctonique (Bourdier & Amblard, 1989 ; Dunstan et al., 1994).

Les stérols les plus remarquables de ce taxon sont le trans-22-dehydrocholestérol qui est généralement dominant et peut ainsi représenter jusqu'à 70-80% des stérols totaux (Orcutt & Patterson, 1975 ; Volkman et al., 1980a), le 24-méthylènecholestérol (Parrish et al., 2000) qui est souvent utilisé en tant que marqueur chémotaxonomique de cette classe d'algue, et le brassicastérol (Volkman, 1986).

Les pigments majoritaires des **chlorophycées** sont la chl *b*, la violaxanthine, la néoxanthine et la lutéine (Hooks et al., 1988 ; Kleppel et al., 1998a). Cette dernière est caractéristique de cette classe d'algue.

Leur composition en AG est représentée par de fortes proportions en AGPI à 16 et 18 atomes de carbone des séries (n-3) et (n-6) (Johns et al., 1979 ; Pohl, 1982 ; Volkman et al., 1989 ; Scribe et al., 1991) et par l'absence d'AGPI à 20 et 22 atomes de carbone.

Ces algues ont une composition en stérols complexe (Iatrides et al., 1983), avec de fortes teneurs en β -sitostérol, stigmastérol et campestérol (Volkman, 1986).

Le pigment marqueur des **cryptophycées** est l'alloxanthine (Wright & Shearer, 1984 ; Gieskes & Kray, 1986). Ces algues présentent aussi de fortes teneurs en 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3), tout comme les dinophycées et les chrysophycées (Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998). De la même manière, le brassicastérol est généralement le stérol dominant chez les cryptophycées (Volkman, 2003).

Les **chrysophycées** montrent de fortes teneurs en chl *c₁* et *c₂*, fucoxanthine et violaxanthine (Jeffrey & Vesk, 1997). Certaines études ont utilisé la somme des concentrations en fucoxanthine et violaxanthine pour caractériser la biomasse de ces organismes (Andersen et al., 1996). Comme les cryptophycées et les dinophycées, elles ont de fortes teneurs en 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) (Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998). Leur composition en stérols est dominée par le stigmastérol qui est aussi présent en quantités importantes chez les chlorophycées (Volkman, 1986).

La composition pigmentaire des **dinophycées** dépend de la nature auto- ou hétérotrophe des espèces considérées. Ainsi, les organismes autotrophes ont pour marqueur chémotaxonomique la péridinine (Kleppel & Pieper, 1984 ; Nelson, 1989), alors que les

formes hétérotrophes ne possèdent pas ce pigment, mais présentent des teneurs importantes en 19'-hexanoyloxyfucoxanthine, en 19'-butanoyloxyfucoxanthine et en fucoxanthine (Kleppel et al., 1988 ; Wright et al., 1991 ; Millie et al., 1993).

La composition en AG de ces organismes est marquée par de fortes proportions en 18:1(n-9), 18:4(n-3), 18:5(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) (Mayzaud et al., 1976 ; Holz & Conner, 1987 ; Ahlgren et al., 1992 ; Conte et al., 1994 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998). Toutefois, le 18:5(n-3), souvent signalé comme marqueur de ces algues, n'est pas toujours présent car sa synthèse est fluctuante (Sargent et al., 1995).

Les stérols marqueurs des dinophycées auto- et hétérotrophes sont le dinostérol et les 4-méthylstérols, composés uniquement rencontrés chez ces algues (Nichols et al., 1983 ; Volkman, 2003).

La zéaxanthine est le pigment généralement utilisé comme marqueur des **cyanobactéries**. En effet, la myxoxanthophylle et l'échinénone sont aussi des pigments abondants chez plusieurs espèces (Mantoura & Llewellyn, 1983 ; Millie et al., 1993) mais, selon Nichols (1973), on les rencontre uniquement chez les cyanobactéries filamenteuses d'eau douce.

Elles possèdent aussi de fortes teneurs en 18:1(n-7), 18:3(n-3), 18:3(n-6) et 18:2(n-6) (Sargent et al., 1987 ; Napolitano, 1998), et seraient incapables de synthétiser des AGPI à 20 et 22 atomes de carbone (Pohl, 1982).

Enfin, les cyanobactéries, comme les autres organismes procaryotes, sont généralement considérées comme étant incapables de synthétiser des stérols *de novo*. Toutefois, certains auteurs relatent la présence de ST chez ces organismes, mais en quantités très inférieures à celles observées chez les algues eucaryotes, leur réelle existence au sein de ce groupe est par conséquent largement discutée (Volkman, 2003).

Groupe algal	Pigments majoritaires ou caractéristiques	Source bibliographique
Détritus	dérivés de fucoxanthine, chlorophyllides <i>a</i> et <i>b</i>	Kleppel et al., 1988 ; Ridout & Morris, 1988
Prochlorophytes	DV chl <i>a</i> et <i>b</i> , MV chl <i>b</i> , chl <i>a</i> et <i>b</i> , zéaxanthine, α - et β -carotène	Andersen et al., 1996
Cyanobactéries	chl <i>a</i> , MV chl <i>a</i> , myxoxanthophylle, échinénone, oscillaxanthine, zéaxanthine , β -carotène, phycoérythrine, phycocyanine, allophycocyanine	Mantoura & Llewellyn, 1983 ; Millie et al., 1993 ; Andersen et al., 1996
Cryptophycées	chl <i>a</i> , MV chl <i>a</i> , chl <i>c</i> ₂ , alloxanthine , phycoérythrine ou phycocyanine, crocoxanthine, monadoxanthine, α -carotène	Wright & Shearer, 1984 ; Gieskes & Kray, 1986 ; Andersen et al., 1996
Chlorophycées	MV chl <i>a</i> et <i>b</i> , chl <i>a</i> et <i>b</i> , lutéine , violaxanthine, néoxanthine, antheraxanthine, zéaxanthine, α - et β -carotène	Hooks et al., 1988 ; Andersen et al., 1996 ; Kleppel et al., 1998a
Euglénophytes	chl <i>a</i> et <i>b</i> , β -carotène, diadinoxanthine, zéaxanthine, néoxanthine	Jeffrey & Vesk, 1997
Bacillariophytes	chl <i>a</i> , MV chl <i>a</i> , chl <i>c</i> ₁ , chl <i>c</i> ₂ , fucoxanthine + diadinoxanthine , diatoxanthine, β -carotène	Wright & Shearer, 1984 ; Quiblier et al., 1994 ; Andersen et al., 1996
Dinophycées	chl <i>a</i> , MV chl <i>a</i> , chl <i>c</i> ₂ , péridinine (autotrophes), 19'-hexanoyloxyfucoxanthine (hétérotrophes), 19'-butanoyloxyfucoxanthine (hétérotrophes), fucoxanthine (hétérotrophes), dinoxanthine, diadinoxanthine, diatoxanthine, β -carotène	Kleppel & Pieper, 1984 ; Kleppel et al., 1988 ; Nelson, 1989 ; Wright et al., 1991 ; Millie et al., 1993 ; Andersen et al., 1996
Chrysophycées	chl <i>a</i> , MV chl <i>a</i> , chl <i>c</i> ₁ , chl <i>c</i> ₂ , fucoxanthine + violaxanthine , β -carotène, 19'-butanoyloxyfucoxanthine, diadinoxanthine	Andersen et al., 1996
Zooplankton	astaxanthine , canthaxanthine	Juhl et al., 1996

Tableau I 2 : Distribution des pigments photosynthétiques au sein du plancton d'eau douce.

Les pigments chlorophylliens et caroténoïdes en gras sont considérés comme des marqueurs chémotaxonomiques potentiels.

Groupe taxonomique	Acides gras majoritaires ou caractéristiques	Source bibliographique
MOP détritique	AGS pairs à 24-32 C	Kolattukudy, 1976
Bactéries hétérotrophes	AGR à 15 et 17 C , AG cyclopropylés, 15:0, 16:0, 17:0, 16:1(n-7), 18:1(n-7)	Perry et al., 1979 ; Volkman et al., 1980 ; Parkes & Taylor, 1983 ; Sargent et al., 1995
Cyanobactéries	16:1(n-7), 18:1(n-7), 18:3(n-6), 18:2(n-6), 18:3(n-3)	Pohl, 1982 ; Sargent et al., 1987 ; Napolitano, 1998
Cryptophytes	18:1(n-9), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3), 22:6(n-3)	Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998
Chlorophycées	18:1(n-9), 16:2(n-6), 16:3(n-3), 16:4(n-3), 18:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3)	Johns et al., 1979 ; Pohl, 1982 ; Volkman et al., 1989 ; Scribe et al., 1991 ; Desvillettes, 1994 ; Léveillé et al., 1997 ; Napolitano, 1998
Bacillariophytes	16:1(n-7), 16:2(n-4), 16:2(n-7), 16:3(n-4), 16:4(n-1) , 20:4(n-6), 20:5(n-3), 22:6(n-3)	Volkman et al., 1981 ; Sicko-Goad et al., 1988 ; Bourdier & Amblard, 1989 ; Dunstan et al., 1994 ; Pond et al., 1998
Dinophycées	18:1(n-9), 18:4(n-3), 18:5(n-3), 20:5(n-3), 22:6(n-3)	Mayzaud et al., 1976 ; Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Bourdier, 1985 ; Holz & Conner, 1987 ; Ahlgren et al., 1990, 1992 ; Conte et al., 1994 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998
Chrysophycées	18:4(n-3), 20:5(n-3), 22:6(n-3)	Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998

Tableau I 3 : Distribution des acides gras au sein du plancton.

Les AG en gras sont considérés comme des marqueurs chémotaxonomiques potentiels.

Groupe taxonomique	Stérols majoritaires ou caractéristiques	Source bibliographique
Cyanobactéries	β -sitostérol, cholestérol, campestérol	Volkman, 1986
Cryptophycées	brassicastérol	Volkman, 2003
Chlorophycées	β -sitostérol, stigmastérol, campestérol, ergostérol, stellastérol	Volkman, 1986 ; Volkman et al., 1998
Euglénophytes	β -sitostérol, ergostérol, fungistérol, 7-dehydrositostérol, stellastérol	Volkman et al., 1998
Bacillariophytes	trans-22-dehydrocholestérol, brassicastérol, cholestérol, 24-méthylènecholestérol , β -sitostérol dinostérol , dehydrodinostérol, 4-méthylstérols ,	Orcutt & Patterson, 1975 ; Volkman et al., 1998 ; Parrish et al., 2000 ; Volkman, 2003
Dinophycées	dimethyldihydrocholestérol, cholestérol, cholestanol, 24-méthylènecholestérol	Nichols et al., 1983 ; Volkman et al., 1998 ; Parrish et al., 2000
Chrysophycées	poriférostérol, β -sitostérol, 24-méthylènecholestérol ; 24-éthylcholesta-5,24(28)(Z)-dien-3 β -ol, brassicastérol	Volkman, 1986, 2003 ; Volkman et al., 1998
Protozoaires	tétrahymanol	Harvey et al., 1997
Zooplancton	trans-22-dehydrocholestérol, trans-22-dehydrocholestanol, 24-nordehydrocholestérol, 24-nordehydrocholestanol, cholestérol, cholestanol, ocellasterol	Parrish et al., 2000

Tableau I 4 : Distribution des stérols chez les organismes planctoniques.
Les stérols en gras sont considérés comme des marqueurs chémotaxonomiques potentiels.

e. Les crustacés zooplanctoniques

Les pigments propres aux cladocères et aux copépodes sont l'astaxanthine et la canthaxanthine ; ils sont localisés dans les gouttelettes lipidiques de ces organismes et proviennent du catabolisme du β -carotène d'origine alimentaire (Juhl et al., 1996).

On considère généralement que la composition en AG des LN des crustacés résulte de la recombinaison des AG d'origine alimentaire avec ceux pouvant être synthétisés *de novo* par le zooplancton (Desvilettes et al., 1997b). Toutefois, de nombreuses études ont montré que les capacités de néosynthèse des AG chez ces arthropodes sont souvent limitées (Goulden & Place, 1990) et dépendent du type d'organisme considéré. Ainsi, les copépodes auraient des capacités importantes de bioconversion des AGPI d'origine alimentaire (Desvilettes et al., 1997b), alors que les cladocères, notamment les daphnidae, seraient plus limités dans ce domaine (Gulati & DeMott, 1997).

En ce qui concerne les ST, de nombreuses études ont considéré que les crustacés étaient incapables de synthétiser ces composés *de novo*, en particulier le cholestérol, et devaient en conséquence les obtenir de leur source de nourriture afin d'assurer leur croissance et leur survie (Kanazawa, 1984, 2001 ; Teshima, 1991).

4. Indicateurs de transfert trophique

La stabilité métabolique de certains composés, c'est-à-dire la conservation de leur structure après consommation, permet de les utiliser en tant que traceurs des relations proie-prédateur. C'est le cas des pigments car, bien que les analyses pigmentaires concernant le zooplancton soient réalisées sur des individus entiers, ceux-ci ne possèdent comme pigments intrinsèques que l'astaxanthine et la canthaxanthine (Juhl et al., 1996). La détection d'autres pigments dans ces organismes est donc uniquement liée à leur présence dans le tractus digestif

et permet par conséquent d'identifier les particules autotrophes récemment ingérées par le zooplancton.

En ce qui concerne les AG, on considère généralement que la composition en AG des lipides de réserve, principalement des TG, et, dans une moindre mesure, des CE, reflète le passé nutritionnel à plus ou moins long terme des crustacés planctoniques (Lee et al., 1971a, b). En effet, une étude menée par Goulden et al. (1998) a permis de montrer que, chez deux espèces de *Daphnia*, 98% des AG des lipides neutres avaient une origine alimentaire, et seulement 2% de ces AG provenaient de synthèse *de novo* réalisée par ces crustacés. De la même manière, une expérience de nutrition au cours de laquelle le copépode *Acartia tonsa* fut nourri avec un cilié bactériovore et réalisée par Ederington et al. (1995) a montré l'accumulation et le transfert d'AG d'origine bactérienne chez le copépode et le cilié. Ainsi, plusieurs études ont pu définir le régime alimentaire des microcrustacés zooplanctoniques à l'aide des AG (Lee et al., 1971a, b ; Kattner et al., 1989 ; Falk-Petersen et al., 1990). Toutefois, les résultats obtenus montrent que des bioconversions et elongations de certains AG peuvent avoir lieu, mais aussi que des mécanismes d'utilisation sélective de composés précis peuvent survenir. Ainsi, il a été suggéré que plusieurs espèces de copépodes étaient capables de synthétiser du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) à partir du 18:3(n-3) provenant de la nourriture ; c'est le cas par exemple du cyclopoïde d'eau douce *Eucyclops serrulatus* (Desvillettes et al., 1997b) et de l'harpacticoïde marin *Tisbe* sp. (Norsker & Støttrup, 1994 ; Nanton & Castell, 1998). De la même manière, plusieurs auteurs ont proposé des voies de biosynthèse des AG chez certains copépodes marins (Kanazawa et al., 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Kattner & Hagen, 1995) (Fig. I 8).

Comme nous l'avons expliqué précédemment, il a longtemps été considéré que les crustacés nécessitaient des sources alimentaires de stérols pour leur croissance et leur métabolisme car les animaux seraient incapables de néosynthétiser ces composés (Kanazawa,

1984 ; Teshima, 1991). Le cholestérol est un précurseur des hormones sexuelles, stéroïdes et de mue, des sels biliaires et de la vitamine D (Kanazawa, 2001). De nombreux auteurs se sont intéressés à la composition et au métabolisme de ces composés chez les crustacés utilisés en aquaculture (revue de Kanazawa, 2001). Ainsi, il a été observé que le principal stérol de ces organismes est le cholestérol, et qu'il constitue entre 90 et 95% des stérols totaux, les autres composés étant principalement des stérols en C₂₈ et C₂₉. En 1997, Teshima et al. ont montré que les juvéniles de *Macrobrachium rosenbergii* étaient capables de synthétiser *de novo* du cholestérol, mais qu'ils nécessitaient tout de même une source alimentaire de cholestérol pour assurer un taux de croissance optimal. De plus, les crustacés seraient capables de désalkyler les stérols en C₂₈ et C₂₉ d'origine alimentaire pour synthétiser du cholestérol (Fig. I 10 ; Teshima, 1982).

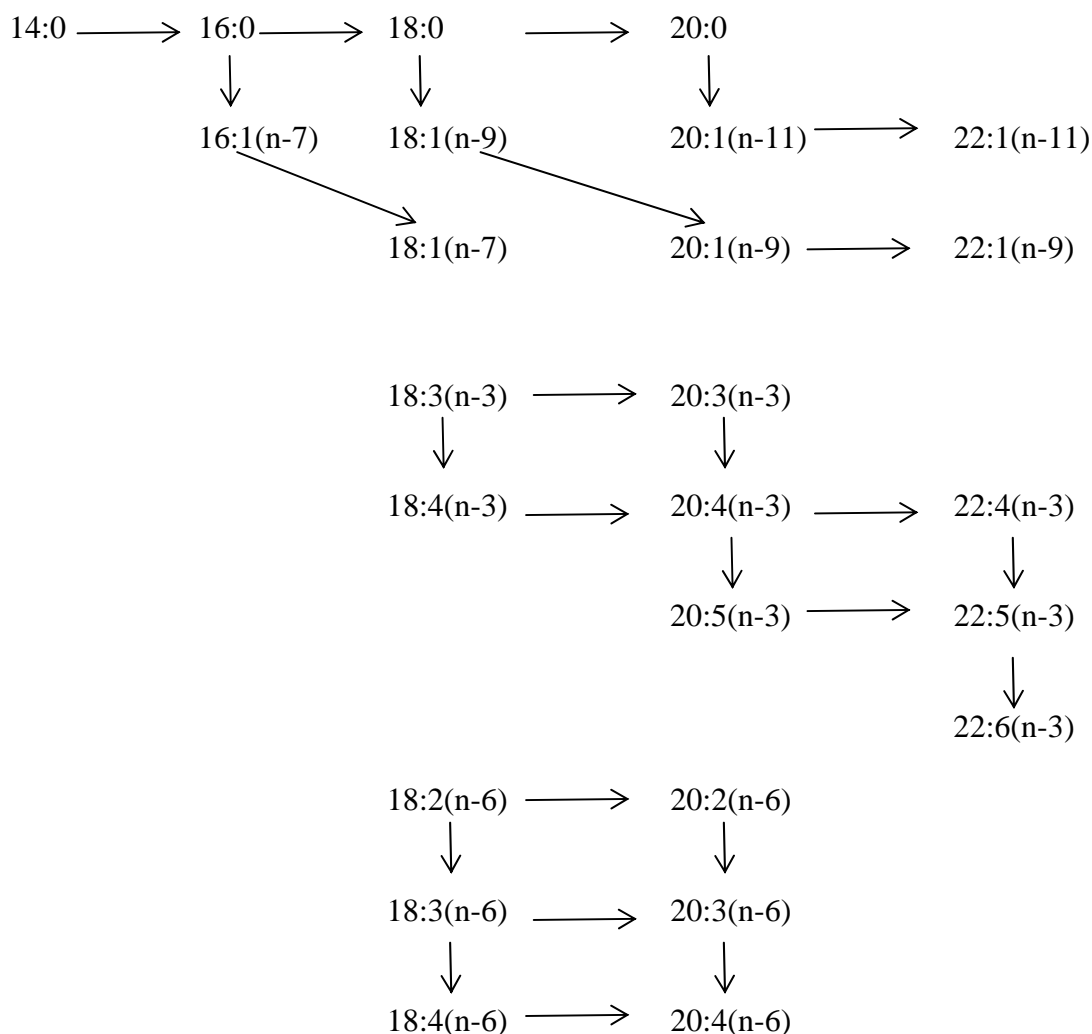


Figure I 9 : Voies de biosynthèse des AG chez les copépodes marins (d'après Kanazawa et al., 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Kattner & Hagen, 1995)

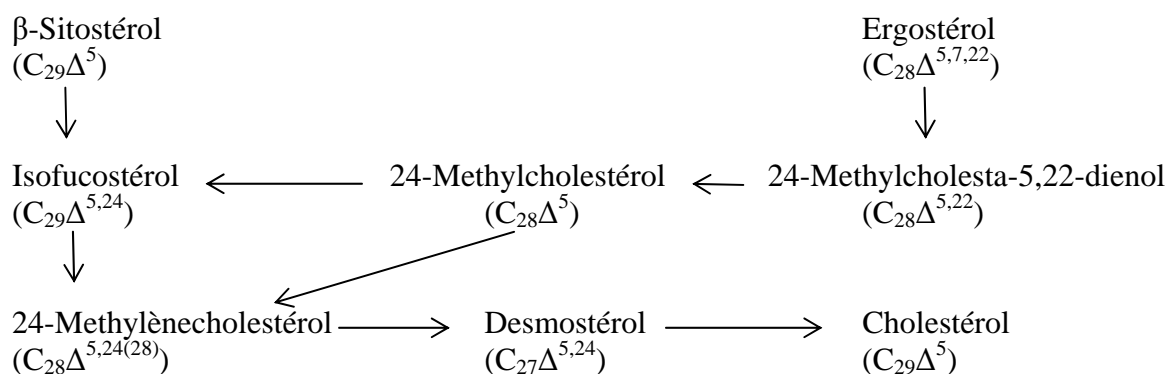


Figure I 10 : Mécanisme de désalkylation en C-24 des phytostérols à 28 et 29 atomes de carbone chez les crustacés (d'après Teshima, 1982)

5. Limites de l'utilisation des biomarqueurs

a. Pour l'estimation de la biomasse microbienne

Un composé (AG, ST, pigment) pris isolément est rarement spécifique d'un groupe taxonomiquement homogène d'organismes. Généralement, un taxon est caractérisé par la présence d'une série d'AG, de pigments ou de ST. De plus, la composition biochimique d'un type d'organisme peut varier en fonction des conditions environnementales (lumière, température, nutriments, phase de croissance, période de stress) (Parrish & Wangersky, 1987 ; Gordillo et al., 1998). Il est donc nécessaire de réaliser des comptages cellulaires en parallèle afin de confirmer la présence et l'abondance relative des différentes composantes de la MOP.

b. Pour visualiser les relations trophiques

Certains composés sont peu stables chimiquement et sont dégradés par les enzymes digestifs du zooplancton. C'est le cas par exemple des chlorophylles dont la cinétique de dégradation dans le tractus digestif des copépodes a largement été étudiée (Head & Harris, 1992, 1994, 1996 ; Pasternak, 1994 ; Peterson & Dam, 1996 ; Kleppel, 1998 ; Descy et al., 1999 ; Stacey et al., 1999) et semble très variable. De la même manière, les taux de destruction des caroténoïdes dans le tractus digestif des copépodes varieraient de 0 à 100%, ils dépendraient du pigment considéré (Descy et al., 1999), du stade de développement et de l'espèce zooplanctonique, mais aussi de son passé nutritionnel (Lopez et al., 1988a ; Penry & Frost, 1991 ; Head, 1992).

Les AG peuvent également, comme nous l'avons précisé précédemment, subir des élongations, des désaturations ou des hydrogénations. C'est le cas par exemple du 20 :5 (n-3) et du 22 :6 (n-3) présents en proportions importantes chez les copépodes calanoïdes, et qui proviennent en partie de la nourriture et en partie de mécanismes bioconversion du 18 :3 (n-3) d'origine alimentaire (Sargent & Whittle, 1981).

De la même manière, nous avons vu que les phytostérols en C₂₈ et C₂₉ d'origine alimentaire peuvent subir une désalkylation chez les crustacés dont le produit final est le cholestérol (Fig. I 10 ; Teshima, 1982).

6. Rôle et métabolisme des lipides chez les copépodes calanoïdes

Le métabolisme lipidique des copépodes calanoïdes a essentiellement été étudié dans les milieux marins polaires. Dans ces écosystèmes, la période de bloom phytoplanctonique est courte, le cycle biologique des calanoïdes est par conséquent de type univoltin, et la survie pendant la saison hivernale est généralement assurée par les stades adultes (Kattner & Hagen, 1995). Pour se développer dans de tels milieux, ces copépodes ont adopté une stratégie d'accumulation de quantités considérables de réserves énergétiques qui leur permettent d'assurer leur survie en période de carence nutritive du milieu ou de gel hivernal (Sargent & Falk-Petersen, 1988). Ces réserves sont essentiellement constituées de lipides, stockés sous la forme de CE et/ou de TG dans des gouttelettes lipidiques et/ou un "sac à huile" (Sargent & Falk-Petersen, 1988 ; Kattner et al., 1994). Ces lipides de réserve peuvent représenter jusqu'à 70% du poids sec de l'adulte chez les calanoïdes polaires tels que *Calanus finmarchicus*, et jusqu'à 60% chez certains calanoïdes lacustres (Arts et al., 1993 ; Albers et al., 1996 ; Vanderploeg et al., 1998). De nombreux auteurs se sont alors intéressés à la stratégie de stockage de ces lipides (Tande & Henderson, 1988 ; Arts et al., 1993 ; Kattner et al., 1994 ; Schnack-Schiel & Hagen, 1994 ; Vanderploeg et al., 1998 ; Jónasdóttir, 1999). En effet, certaines espèces présenteraient d'importantes quantités de CE et peu ou pas de TG alors que d'autres stockeraient uniquement des TG. En milieu marin, il est généralement reconnu que les CE seraient préférentiellement accumulés par les calanoïdes strictement herbivores, qui doivent donc faire face à une forte variabilité de la disponibilité en nourriture, alors que les organismes à tendance omnivore ou carnivore, pouvant se nourrir toute l'année,

accumuleraient plutôt des TG (Falk-Petersen et al., 1999). Chez les organismes possédant les deux types de lipides de réserve, les TG seraient mobilisés plus rapidement que les CE en période de jeûne (Lee et al., 1974 ; Lee & Barnes, 1975 ; Sargent et al., 1977 ; Hakanson, 1984).

Chez les calanoïdes polaires, les quantités de CE et de TG sont très variables au cours de l'année et dépendent du cycle biologique de l'espèce considérée. Les stades âgés (CIII à Ad. selon l'espèce) stockent d'importantes quantités de lipides de réserve, alors que les jeunes stades les utilisent pour assurer leur croissance (Kattner & Krause, 1987). Les lipides de réserve ont deux rôles principaux chez ces organismes, ils fournissent l'énergie métabolique nécessaire à leur survie pendant les périodes où ils ne se nourrissent pas (période de gel hivernal ou de faible production primaire), et ils jouent un rôle primordial dans les processus de reproduction et de développement embryonnaire. Chez les femelles, ils assurent la production et la maturation des gonades (Hopkins et al., 1984 ; Sargent & Falk-Petersen, 1988). De plus, les femelles déposent dans les œufs d'importantes quantités de lipides de réserve qui seront consommés pendant l'embryogénèse et le développement des premiers stades nauplii (Lee et al., 1972, 1974). Chez les mâles, ils sont utilisés pendant la copulation et l'attachement des spermatophores (Hopkins et al., 1984 ; Sargent & Falk-Petersen, 1988). Enfin, les CE joueraient un rôle dans la régulation de la flottabilité (Sargent & Henderson, 1986).

On considère généralement que la composition en AG et en alcools gras des CE seraient le reflet du passé nutritionnel à long terme des copépodes alors que celle des TG correspondrait à leur passé nutritionnel à court terme, de l'ordre de quelques jours (Hakanson, 1984). Cependant, les AG et alcools gras constituant les CE et TG peuvent avoir des origines différentes : ils peuvent dériver de la nourriture et être incorporés sans changement ; c'est le cas par exemple des AG essentiels. Ils peuvent également être synthétisés *de novo*. Les AG

d'origine alimentaire peuvent aussi subir des élongations et des désaturations : c'est par exemple le cas de la plupart des alcools gras composant les CE qui sont formés par modification des AG provenant de la nourriture (Sargent & Falk-Petersen, 1988 ; Albers et al., 1996). Enfin, la présence d'AGPI dans les lipides de réserve permettrait de maintenir la fluidité des lipides dans les gouttelettes lipidiques à basse température (Albers et al., 1996).

Les autres lipides rencontrés chez les copépodes sont principalement des phospholipides et des stérols, qui sont les constituants principaux des membranes cellulaires (Geise, 1966). Chez les calanoïdes polaires, les PL ont généralement un haut degré d'insaturation, avec des teneurs importantes en 22:6(n-3) (Sargent & Henderson, 1986) ; la présence de ces AGPI assure une importante fluidité membranaire des cellules et rend par conséquent ces organismes bien adaptés aux milieux froids dans lesquels ils vivent (Albers et al., 1996).

Enfin, il est probable que les stérols ont un rôle dans les mécanismes de reproduction et de croissance des copépodes. A ce sujet, la plupart des études concernant le rôle de ces composés chez les arthropodes a été consacrée aux crevettes pénaéides utilisées en aquaculture. Chez ces organismes, les ovaires contiennent d'importantes quantités de stérols (Middleditch et al., 1980 ; Teshima & Kanazawa, 1983 ; Morente & Rodriguez, 1991 ; Ravid et al., 1999 ; Wouters et al., 1999). De plus, ces composés sont essentiels pour la croissance des juvéniles (D'Abramo, 1989) ainsi que pour la maturation et la reproduction des adultes (Kanazawa et al., 1988).

CHAPITRE II :

MATERIEL ET METHODES

I. Protocole d'échantillonnage en milieu naturel

La figure II 1 décrit brièvement les différentes étapes d'étude de la composition taxonomique et des analyses biochimiques que nous avons effectuées pour caractériser la MOP et le zooplancton du lac de La Godivelle-d'en-Haut.

A. Paramètres abiotiques et biotiques classiques

1. Température et transparence de l'eau

La température de la colonne d'eau est mesurée *in situ* grâce à une sonde multiparamètre (WTW© Multi 197).

La transparence de l'eau est évaluée par mesure de la profondeur de disparition du disque de Secchi.

2. Eléments minéraux

L'eau destinée à l'analyse des concentrations en éléments minéraux provient de prélèvements intégrés sur la colonne d'eau comprise entre 0 et 20m de profondeur, comme décrit ci-après (paragraphe I B 1).

Les dosages sont réalisés selon les normes AFNOR préconisées dans les grilles d'évaluation de la qualité de l'eau (MEDD & Agences de l'Eau, 2003). Nous avons ainsi déterminé les concentrations en silice (SiO_2 , AFNOR NF T 90-007), nitrates (NO_3^- , AFNOR NF T 90-012), nitrites (NO_2^- , AFNOR NF T 90-013) et ammonium (NH_4^+ , AFNOR T 90-015).

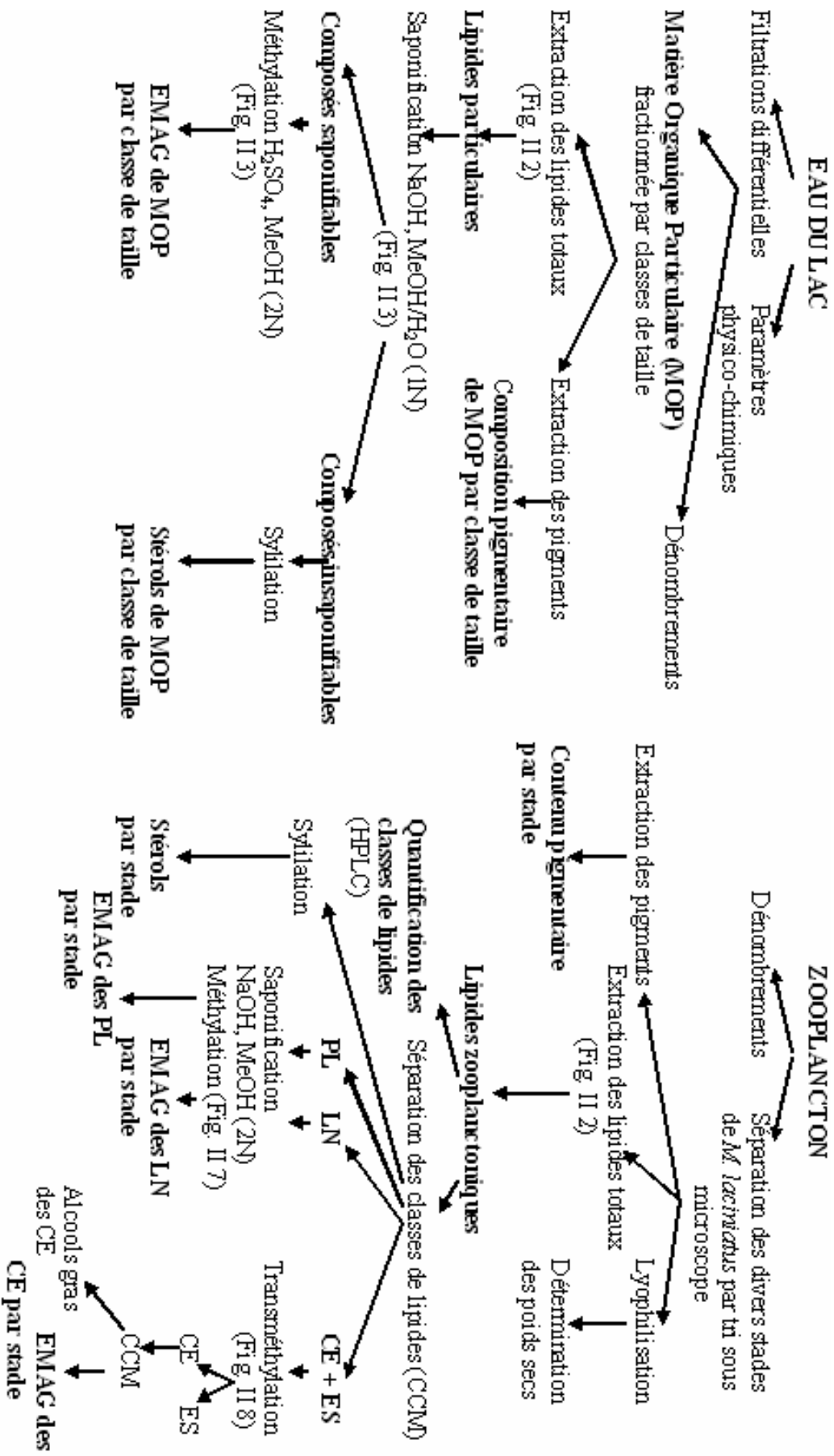


Figure II 1 : Protocole d'étude de la matière organique particulaire et du zooplankton prélevés dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut

4. Chlorophylle *a*

L'eau destinée à l'analyse des concentrations en chlorophylle *a* (chl *a*) est prélevée par siphonage de la colonne d'eau 0-20m, comme décrit ci-après (paragraphe I B 1).

Les concentrations en chl *a* sont déterminées par HPLC, selon la méthode décrite ci-après pour l'analyse de la composition pigmentaire de la MOP (paragraphe III A 2). Les teneurs en chl *a* mesurées pour les classes de taille [30-100], [5-30] et [0,7-5] sont sommées afin d'obtenir une estimation de la concentration en chl *a* totale ([0,7-100]).

B. Matière organique particulaire (MOP)

1. Prélèvement

L'eau destinée à l'analyse de la MOP provient de prélèvements intégrés sur la colonne d'eau 0-20m et réalisés au centre du lac de La Godivelle-d'en-Haut. Ces prélèvements sont effectués par siphonage à l'aide d'un tube lesté. Pour chaque date d'échantillonnage, quinze prélèvements ont ainsi été réalisés afin de récolter un volume total de 300 l d'eau ; la MOP ainsi prélevée est alors fractionnée en classes de taille au laboratoire.

2. Fractionnement en classes de taille

Dès le retour au laboratoire, l'eau récoltée par siphonage est, dans un premier temps, filtrée par gravité sur de la toile à blutter de 100µm de vide de maille afin d'éliminer les particules de grande taille telles que les organismes zooplanctoniques.

L'eau récupérée est ensuite filtrée par gravité sur de la toile à blutter de 30µm de vide de maille. Celle-ci est remplacée plusieurs fois pour éviter tout colmatage, puis elle est rincée à l'eau filtrée du lac afin de récupérer les particules constituant la classe de taille 30µm – 100µm ([30-100]).

Le filtrat obtenu subit alors une filtration tangentielle à l'aide d'une pompe AMICON®. Les particules d'un diamètre supérieur à $0,2\mu\text{m}$ sont ainsi concentrées dans un volume final de 500ml. Ce concentrat est ensuite filtré sur de la toile à blutter de $5\mu\text{m}$ de vide de maille sous un vide modéré créé à l'aide d'une pompe à vide. Les particules retenues sur la toile à blutter sont collectées en rinçant les filtres à l'eau filtrée du lac, elles composent la classe de taille $5\mu\text{m} - 30\mu\text{m}$ ([5-30]).

Le troisième filtrat est enfin récupéré sur des filtres Whatman GF/F (diamètre = 47mm ; porosité = $0,7\mu\text{m}$) et constitue la classe de taille $0,7\mu\text{m} - 5\mu\text{m}$ ([0,7-5]).

3. Dénombrements et estimation des biomasses

Sur les deux premiers filtrats sont prélevés trois aliquots de 100ml destinés au dénombrement des microalgues phytoplanctoniques, des ciliés et des flagellés. Sur le troisième filtrat sont également prélevés quatre aliquots en vue de dénombrer les microalgues phytoplanctoniques, les ciliés, les flagellés et le picoplancton eucaryote et procaryote.

a. Picoplancton autotrophe et bactéries hétérotrophes

Après fixation au formaldéhyde (concentration finale = 2%), les bactéries hétérotrophes, les picocyanobactéries et le picoplancton eucaryote autotrophe sont dénombrés par microscopie à épifluorescence (grossissement x1250) après coloration des cellules par un fluorochrome marqueur de l'ADN, le DAPI (4,6-diamidino-2 phénylindol) selon le protocole décrit par Porter & Feig (1980).

Lors des dénombrements au microscope, trois filtres sont utilisés : les bactéries hétérotrophes émettent une fluorescence bleue brillante lors de l'observation des échantillons dans l'ultraviolet alors que le matériel détritique apparaît en jaune pâle ; en lumière bleue, le picoplancton eucaryote autotrophe apparaît de couleur rouge grâce à l'autofluorescence de la

chlorophylle *a* ; enfin, la visualisation des échantillons en lumière verte permet de distinguer les picocyanobactéries qui émettent alors une autofluorescence rouge orangée liée à la phycoérythrine, alors que l'autofluorescence de la chlorophylle *a* sous cette lumière est très faible (Tsuji et al., 1986 ; Stockner & Antia, 1986).

Pour chaque type d'organismes sont estimés le nombre de cellules ainsi que le biovolume cellulaire moyen. Les biomasses sont calculées à partir des biovolumes cellulaires moyens en utilisant les facteurs de conversion suivants :

- Bactéries hétérotrophes : $1\mu\text{m}^3 = 220 \text{ fgC}$ (Bratback, 1985) ;
- Picocyanobactéries : $1\mu\text{m}^3 = 360 \text{ fgC}$ (Verity et al., 1992) ;
- Picoplancton eucaryote autotrophe : $\text{pgC/cell} = 0,216 \times \text{volume}^{0,939} (\mu\text{m}^3)$
(Menden-Deuer & Lessard, 2000).

b. Flagellés

Après fixation à la glutaraldéhyde (concentration finale = 1%), les protozoaires flagellés sont colorés à la primuline selon une modification du protocole de Caron (1983). Les cellules de chaque espèce de flagellés sont ensuite dénombrées par microscopie à épifluorescence et leurs biovolumes cellulaires moyens sont estimés. Ceux-ci sont alors convertis en biomasses selon la formule proposée par Menden-Deuer & Lessard (2000) : $\text{pgC/cell} = 0,216 \times \text{volume}^{0,939} (\mu\text{m}^3)$.

c. Ciliés

Les protozoaires ciliés sont fixés avec une solution saturée de chlorure de mercure (concentration finale = 2,5%), puis dénombrés en microscopie inversée (x400) après sédimentation pendant 48h en cuve d'Utermöhl. Le biovolume cellulaire moyen de chaque

espèce dénombrée permet l'estimation de sa biomasse à l'aide de la formule de Menden-Deuer & Lessard (2000) : $\text{pgC/cell} = 0,216 \times \text{volume}^{0,939} (\mu\text{m}^3)$.

d. Microalgues

Après fixation au lugol fort, les microalgues phytoplanctoniques sont dénombrées au microscope inversé (x10 et x400) selon le protocole d'Utermöhl (1958). Les biovolumes cellulaires mesurés pour chaque espèce sont convertis en biomasse à l'aide des formules suivantes proposées par Menden-Deuer & Lessard (2000) :

- pour les diatomées : $\text{pgC/cell} = 0,288 \times \text{volume}^{0,811} (\mu\text{m}^3)$;
- pour les autres microalgues : $\text{pgC/cell} = 0,216 \times \text{volume}^{0,939} (\mu\text{m}^3)$.

e. Détermination des compositions taxonomiques des différentes classes de taille

Les dénombrements de microorganismes réalisés permettent d'estimer leurs biomasses respectives dans les fractions particulières [0,7-100], [0,7-30] et [0,7-5]. Afin de déterminer les compositions taxonomiques des classes de taille [30-100] et [5-30], les fractions particulières [0,7-30] et [0,7-5] ont été soustraites respectivement aux fractions particulières [0,7-100] et [0,7-30].

4. Préparation et conditionnement des échantillons destinés aux analyses lipidiques et pigmentaires

Les particules constituant les classes de taille [30-100] et [5-30] sont récupérées sur des filtres Whatman GF/C et celles de la classe de taille [0,7-5] sur des filtres Whatman GF/F. Ces filtres ont été préalablement "délipidés" par combustion à 450°C pendant 24h. Les échantillons ainsi obtenus sont congelés à -80°C dans l'attente des analyses biochimiques. Pour chaque date d'échantillonnage et pour chaque classe de taille, sont préparées deux séries

d'échantillons ; la première est destinée à déterminer la composition pigmentaire de la MOP, et la seconde à établir les compositions en AG et en ST extraits des lipides particuliers totaux.

C. Zooplancton

1. Prélèvement

Les organismes zooplanctoniques sont récoltés à l'aide de traits de filet verticaux (vide de maille = 80µm) entre 30m de profondeur et la surface.

2. Dénombrement et identification des espèces zooplanctoniques

Le zooplancton ainsi prélevé est immédiatement anesthésié avec de l'eau gazeuse puis fixé avec une solution de formaldéhyde (concentration finale = 3-5%) tamponnée au borate et additionnée de saccharose afin d'éviter la libération des œufs et la déformation des organismes (Prepas, 1978 ; Downing & Rigler, 1984). Le lendemain, les échantillons sont transférés dans une solution de préservation composée de 70% d'éthanol, de 20% de formaldéhyde et de 10% de glycérol ; celle-ci assure une meilleure conservation de la coloration des organismes et facilite les comptages de zooplancton sous la loupe binoculaire.

L'identification et le dénombrement des organismes sont effectués dans une cuve de Dolfuss et sont généralement précédés d'un fractionnement des prélèvements à l'aide d'une boîte de Motoda (Motoda, 1959), permettant alors d'effectuer des dilutions aux 1/2 ou 1/4 de l'échantillon de départ.

Au cours des dénombrements sont identifiées les différentes espèces de rotifères, de cladocères et de copépodes. Nous déterminons globalement les stades nauplii (N),

copépodites (C) et adultes (Ad.) des cyclopoïdes. En ce qui concerne *Mixodiaptomus laciniatus*, les différents stades de développement (NI à VI, CI à V, Ad.) sont dénombrés, la distinction entre mâles et femelles est effectuée pour les stades CV et Ad. ; enfin, le nombre de femelles ovigères et le nombre d'œufs qu'elles portent (= taille de ponte) sont déterminés.

3. Préparation et conditionnement des échantillons destinés aux analyses lipidiques et pigmentaires

a. Conditionnement

Immédiatement après le prélèvement, le zooplancton destiné aux analyses lipidiques et pigmentaires est anesthésié avec de l'eau gazeuse afin d'éviter l'évacuation des tubes digestifs ou la perte des œufs par les femelles ovigères (Downing & Rigler, 1984). Il est ensuite concentré dans un faible volume d'eau puis placé dans un pot à prélèvement et immédiatement congelé dans de l'azote liquide. De retour au laboratoire, les échantillons sont conservés à -80°C dans l'attente des analyses biochimiques.

b. Tri des organismes pour les analyses

Les analyses lipidiques et pigmentaires concernent les stades de développement majoritaires de *Mixodiaptomus laciniatus* à chaque date d'échantillonnage. Ainsi sont séparés les stades NI en avril, NII-NIII en mai, CI-CII en juin, CII-CIV en septembre, ainsi que les stades CV-Ad. mâles et CV-Ad. femelles à chaque date.

Il est par conséquent nécessaire de réaliser un tri des organismes avant toute analyse : le zooplancton est décongelé partie par partie, puis rincé sur une toile à blutter de 250µm de vide de maille avec de l'eau filtrée. Les stades de développement sont tout d'abord séparés suivant un critère de taille à l'aide de filtrations successives sur des toiles à blutter de 100µm puis de 50µm : la toile à blutter de 100µm retient les stades âgés (CIV à Ad.) de *Mixodiaptomus* ainsi

que la plupart des cladocères et des cyclopoïdes, alors que la toile de 50µm de vide de maille retient les nauplii et les premiers stades copépodites de *Mixodiaptomus* (CI à CIII) ainsi que les petits cladocères, les nauplii de cyclopoïdes et les rotifères. Chacune de ces deux fractions subit alors un second tri à la pince sous une loupe binoculaire, permettant de séparer chaque stade de développement ou sexe de *Mixodiaptomus* des autres organismes et de comptabiliser le nombre d'individus composant chaque échantillon (variable selon les stades de développement et les analyses à effectuer).

Il faut noter que le contenu d'un pot de prélèvement n'est jamais décongelé en une seule fois afin d'éviter la dégradation des pigments ou des lipides. De plus, le tri est effectué sous une loupe binoculaire équipée d'une lumière froide, et dans la glace.

Une fois le tri achevé, chaque échantillon de zooplancton est recueilli sur un filtre Whatman GF/A de 47mm de diamètre avant les analyses lipidiques ou pigmentaires.

II. Etude expérimentale du régime alimentaire de *Mixodiaptomus laciniatus*

1. Choix des sources de nourriture

Les différentes espèces phytoplanctoniques distribuées au copépode en tant que source de nourriture sont choisies en fonction de leur représentativité dans le milieu naturel.

Elles proviennent de Culture Collection of Algae and Protozoa (Cumbria, Grande Bretagne) à l'exception de l'algue *Cosmarium* qui a été gracieusement fournie par le Dr. C. Quiblier du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Ce sont :

- *Cryptomonas* sp. (taille = 11,5 x 6,7µm ; biovolume = 267µm³);
- *Cyclotella meneghiniana*. (taille = 8,2 x 6,3µm ; biovolume = 335µm³);
- *Sphaerocystis* sp. (taille = 9,4 x 7,4µm ; biovolume = 266µm³);
- *Cosmarium impressulum* (taille = 14,4 x 11µm ; biovolume = 1996µm³);

- *Synechococcus elongatus* (taille = $1,6 \times 1,1 \mu\text{m}$; biovolume = $0,93 \mu\text{m}^3$).

2. Culture et élevage des organismes

a. *Mixodiaptomus laciniatus*

Les copépodes sont prélevés régulièrement dans le milieu naturel. De retour au laboratoire, la densité et la composition en terme de stades de développement de *Mixodiaptomus* sont déterminées ; à la période de l'année où ces expériences de nutrition sont effectuées (février à avril), la population est composée d'environ 48% d'adultes matures, 48% de nauplii, et de 4% de copépodites I.

Des aliquots de zooplancton sont disposés dans des erlenmeyers contenant de l'eau du lac filtrée (sur filtre Whatman GF/F) afin d'obtenir une densité de l'ordre de 500 ind./l, densité couramment utilisée pour l'élevage en laboratoire des calanoïdes (Bonnet & Carlotti, 2001 ; Bustillos-Guzmán et al., 2002). Les erlenmeyers sont alors placés dans une chambre thermostatée à 15°C avec une photopériode identique à celle de la période d'échantillonnage.

b. Sources de nourriture

Les différentes proies algales sont cultivées en masse sur le milieu minéral "Synura" dans une chambre thermostatée à 20°C et sous une photopériode de 12h. Chacune des cultures est maintenue en phase exponentielle de croissance par apport de milieu de culture.

3. Déroulement des expériences de nutrition

Les expériences de nutrition sont réalisées en triplicats selon le protocole suivant : Dès leur arrivée au laboratoire, les calanoïdes provenant du milieu naturel sont mis à jeûner pendant 48h. Ils sont ensuite nourris quotidiennement pendant 3 jours avec les différentes sources de nourriture. La ration alimentaire journalière est distribuée à raison de $41 \mu\text{g C/l}$ d'algues

phytoplanctoniques dans chaque bac d'élevage, que la nourriture apportée soit mono- ou plurispécifique.

Pour chaque espèce de microalgue ou de cyanobactérie sont réalisés quotidiennement des comptages cellulaires des cultures ainsi qu'une mesure du biovolume cellulaire moyen. L'utilisation des formules de conversion suivantes nous permettent d'estimer la biomasse cellulaire de chaque algue, et, par conséquent, d'évaluer la quantité de culture à distribuer au calanoïde afin d'obtenir une ration de 41µg C/l d'algue :

- *Synechococcus* : $1\mu\text{m}^3 = 360 \text{ fgC}$ (Verity et al., 1992) ;
- *Cyclotella* : $\text{pgC/cell} = 0,288 \times \text{volume}^{0,811}(\mu\text{m}^3)$ (Menden-Deuer & Lessard, 2000) ;
- Autres microalgues : $\text{pgC/cell} = 0,216 \times \text{volume}^{0,939}(\mu\text{m}^3)$ (Menden-Deuer & Lessard, 2000).

A l'issue du troisième jour d'expérimentation, les calanoïdes sont récupérés 2 heures après le dernier apport alimentaire, puis anesthésiés et congelés à -80°C dans l'attente de leur analyse. Un aliquot de chaque culture d'algue utilisée en tant que source de nourriture est également filtré puis congelé pour l'analyse ultérieure de la composition pigmentaire.

III. Analyses lipidiques et pigmentaires

Toutes les analyses lipidiques et pigmentaires sont effectuées avec des solvants de qualité HPLC provenant de Sigma ou Prolabo. Elles suivent le protocole général décrit à la figure II 1.

A. MOP

1. Analyses lipidiques

a. Extraction des lipides totaux

Le protocole d'extraction des lipides totaux est reporté sur la figure II 2. Il s'agit d'une adaptation (Desvillettes, 1994) de la méthode de Folch et al. (1957). L'extraction est réalisée dans un mélange chloroforme / méthanol chauffé à 56°C pendant 30 minutes. L'adjonction d'eau additionnée de 0,9% de NaCl à l'extrait permet de séparer la phase lipidique du reste du matériel organique.

b. Saponification, séparation des AG et des ST, et méthylation des AG

Dans le but d'analyser les compositions en AG et en ST de la MOP, il est nécessaire au préalable de séparer ces deux types de composés par une hydrolyse alcaline des lipides particuliers totaux suivie d'une saponification (Fig. II 3). Les composés insaponifiables contiennent les stérols, les hydrocarbures et les pigments, ils sont récupérés par des lavages successifs à l'hexane suivis de centrifugations. Les AG sont présents dans la phase saponifiable sous forme de sels sodiques qui doivent subir une méthylation par de l'acide sulfurique méthanolique afin d'être analysés en chromatographie en phase gazeuse (CPG). Les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) ainsi obtenus, composés plus volatiles que les AG sont alors prêts à être injectés en CPG.

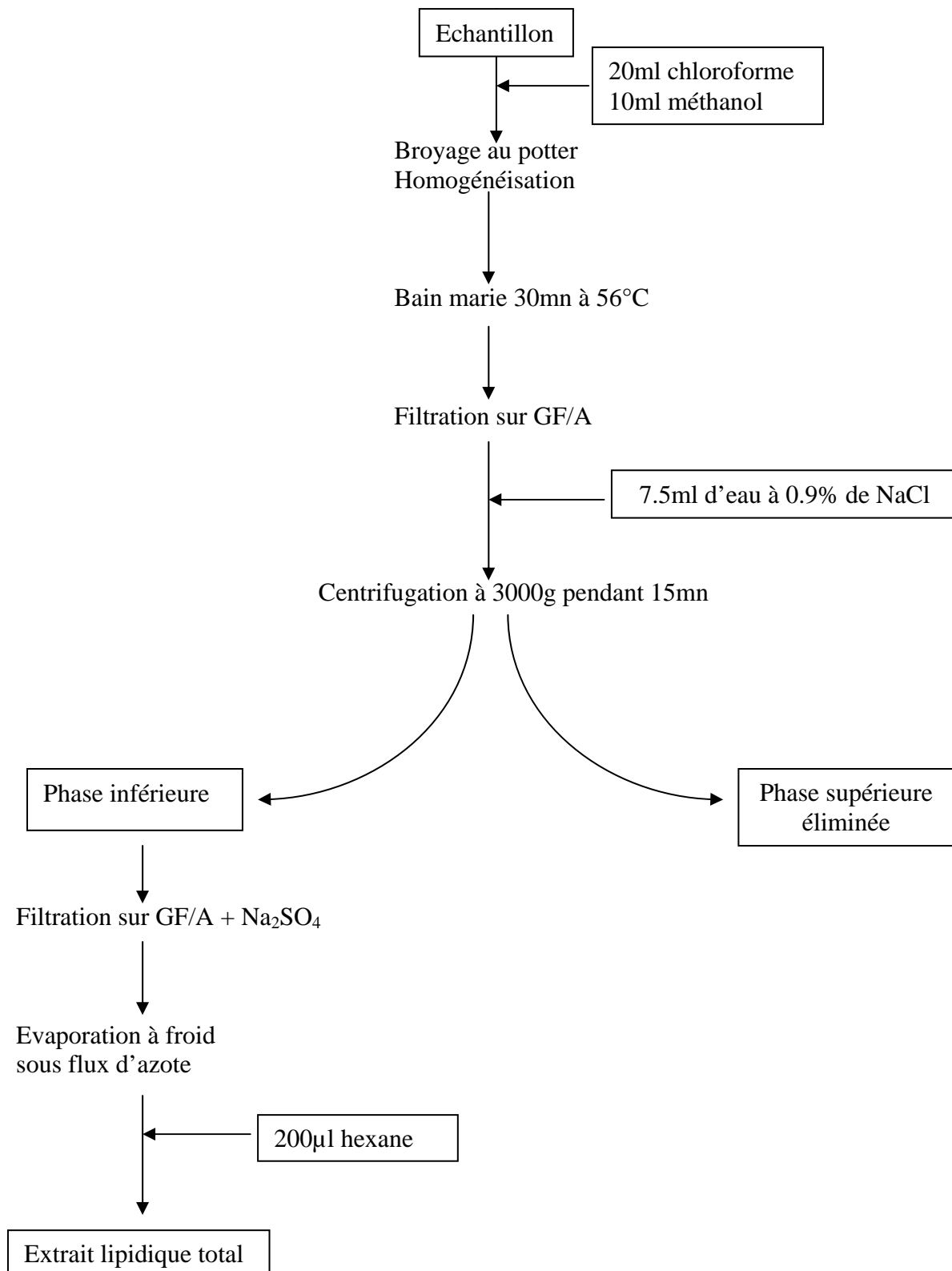


Figure II 2 : Protocole d'extraction des lipides totaux (d'après Folch et al., 1957 ; modifié par Desvillettes, 1994)

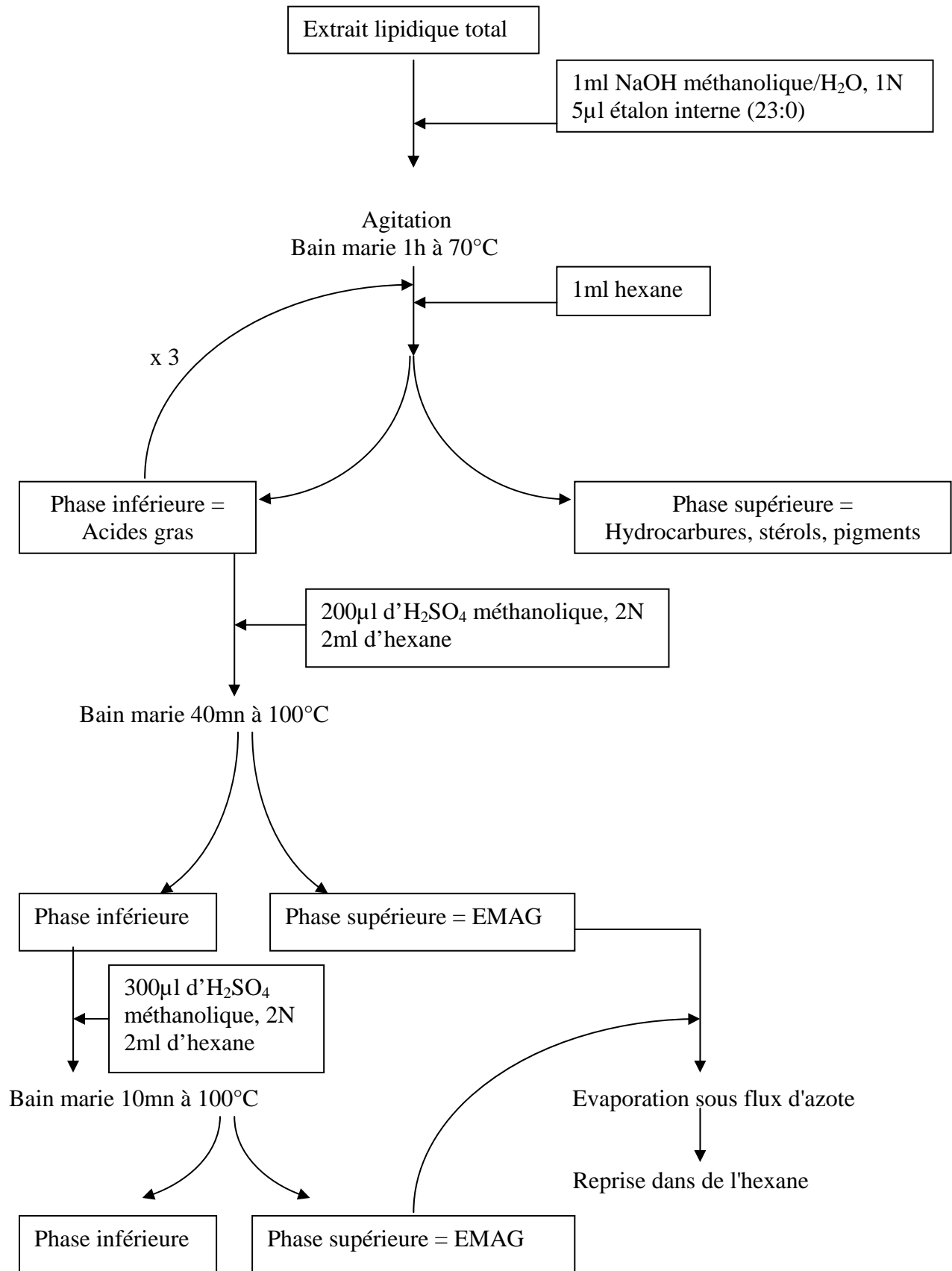


Figure II 3 : Saponification des lipides totaux et préparation des EMAG extraits de la MOP

c. Séparation et identification des esters méthyliques d'AG (EMAG) par chromatographie en phase gazeuse (CPG)

- Appareillage

- Chromatographe Chrompack modèle CP 9001
- Colonne capillaire : L = 60m, diamètre interne = 0,25mm, épaisseur du film = 0,25µm, phase stationnaire BPX 70 (SGE)
- Injecteur : mode SPLIT
- Détecteur à ionisation de flamme (DIF)
- Gaz vecteur : Hélium
- Intégration : programme CP Maître (Chrompack)

- Conditions opératoires

- Conditions de température : injecteur = 250°C, détecteur = 260°C
- Programmation de température du four : 120°C à 245°C, à 3°C/min

- Identification

L'identification des AG est effectuée par comparaison avec des chromatogrammes de mélanges connus d'AG disponibles dans le commerce (Sigma, Supelco, NuCheck). Un exemple de chromatogramme provenant d'un échantillon de *Mixodiptomus* est donné dans la figure II 4.

- Quantification

Au début de la saponification des extraits lipidiques totaux (Fig. II 3) est ajouté à l'échantillon un étalon interne en concentration connue, l'acide tricosanoïque (23:0). Cet AG a

été choisi en raison de son absence des échantillons biologiques et de son comportement chromatographique (pic nettement séparé des autres) (Desvilettes, 1994).

L'adjonction de cet AG permet, d'une part, de quantifier les AG présents dans l'échantillon, et d'autre part, de prendre en compte les éventuelles pertes pouvant survenir au cours de la saponification et de la méthylation.

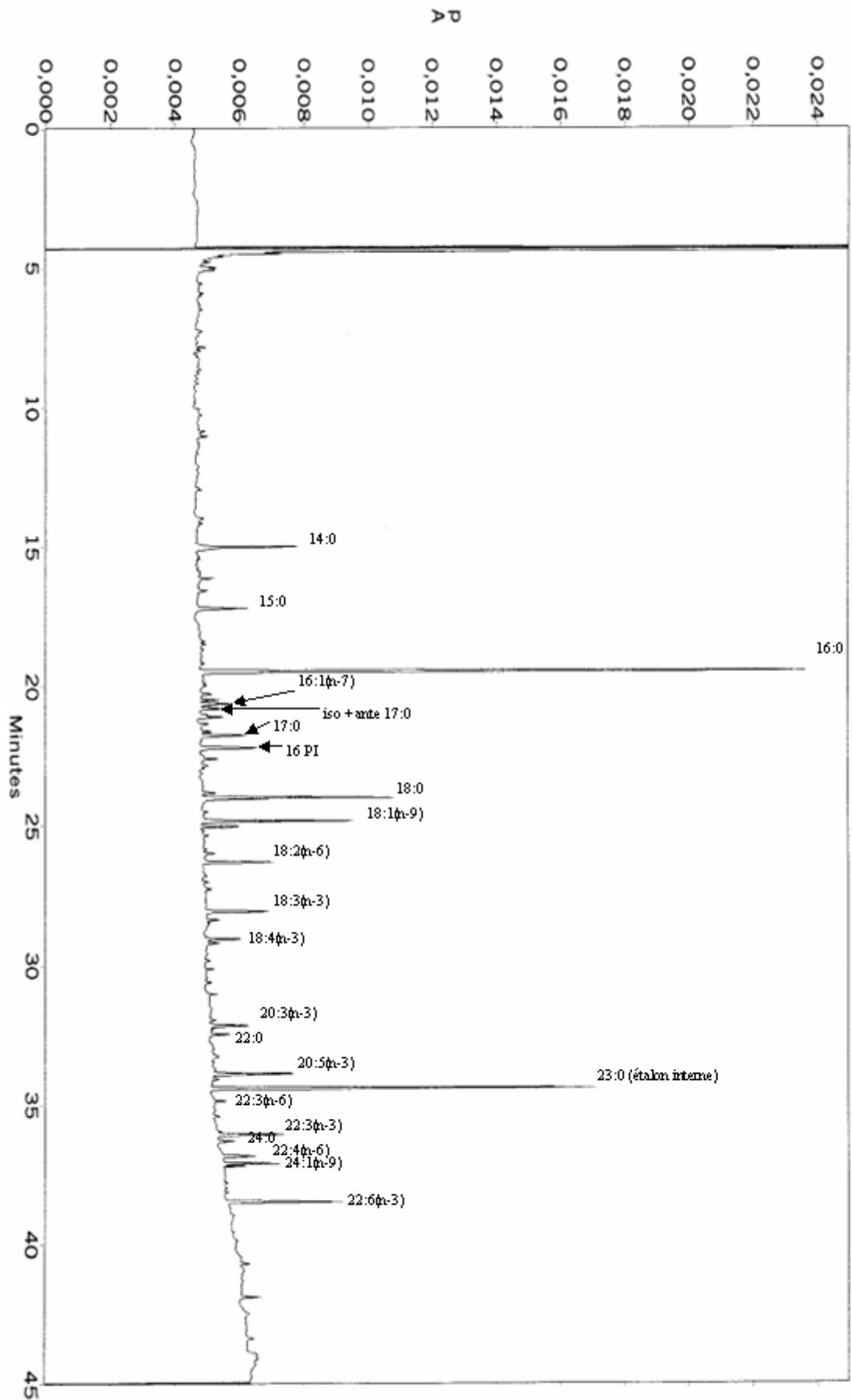


Figure II 4 : Exemple d'analyse de la composition en acides gras. Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de *Mixodiaptomus* (PL des CV-Ad. femelles de novembre)

d. Sylilation des ST

Cette étape a pour objectif de diminuer la polarité des ST afin de les analyser en CPG. Les composés obtenus après cette étape sont des dérivés sylilés résultant de l'adjonction d'un groupement $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ sur une fonction alcool.

Après évaporation à sec des lipides insaponifiables (Fig. II 3), 200 μl de pyridine et 100 μl de BSTFA (N,O-bis(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) sont ajoutés aux échantillons. Ceux-ci sont alors placés au bain marie pendant 1h à 50°C. Après évaporation à sec, les dérivés sylilés sont repris dans un mélange d'acétate d'éthyle et de BSTFA avant leur injection en CPG ou CPG-SM (chromatographie à phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse).

e. Séparation et identification des ST par CPG

Identification par CPG-SM

Cette identification des ST par CPG-SM a été réalisée grâce à une collaboration avec le Dr J.F. Rontani, Chargé de Recherches au Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines (UMR CNRS 6117) et a eu lieu au sein même de ce laboratoire de l'Université Aix-Marseille II.

- Appareillage
 - Chromatographe HP 5890 series II plus
 - Spectromètre de masse HP 5972. La fragmentation des molécules séparées par CPG et entrant dans le détecteur de masse se fait par impact électronique.
 - Injecteur : mode SPLIT
 - Colonne capillaire : L = 30m, diamètre interne = 0,25mm, épaisseur du film = 0,25 μm , phase stationnaire SOLGEL-1 (SGE)
 - Gaz vecteur : Hélium

- Intégration : programme Chemstation (HP)

- Conditions opératoires

- Conditions de température : injecteur = 300°C, détecteur = 260°C

- Spectromètre de masse : température de la source = 170°C, potentiel d'ionisation fixe = 70eV

- Programmation de température du four : de 60°C à 130°C à 30°C/min, puis de 130°C à 250°C à 5°C/min, et enfin de 250°C à 300°C à 2°C/min.

- Pression du gaz vecteur maintenue à 1,04 bar jusqu'à la fin de la programmation de température, puis de 1,04 à 1,5 bar à 0,04 bar/min.

- Identification

Un exemple de chromatogramme provenant d'un échantillon de MOP du lac de La Godivelle-d'en-Haut est représenté sur la figure II 5.

A l'issue de l'injection d'un échantillon en CPG-SM, les données sont réparties selon trois axes, le temps de sortie de la colonne (temps de rétention), la gamme de masse balayée (m/z), l'intensité du signal (Fig. II 5 A). On peut alors obtenir pour chaque composé un spectre de masse correspondant à l'intensité des ions issus de la syllilation en fonction de la gamme de masse (Fig. II 5B, C).

L'identification des ST est réalisée par comparaison des spectres de masse ainsi obtenus avec ceux disponibles dans la bibliothèque du logiciel Chemstation, comprenant en particulier les spectres de masse de la banque de données du NIST (National Institut of Standards and Technology, U.S.A.). Lors de la comparaison du spectre de masse du composé inconnu avec ceux de la banque de données, le logiciel Chemstation propose plusieurs solutions et affecte pour chacune d'elles un pourcentage d'homologie (compris en 0 et 100%). Pour les spectres de

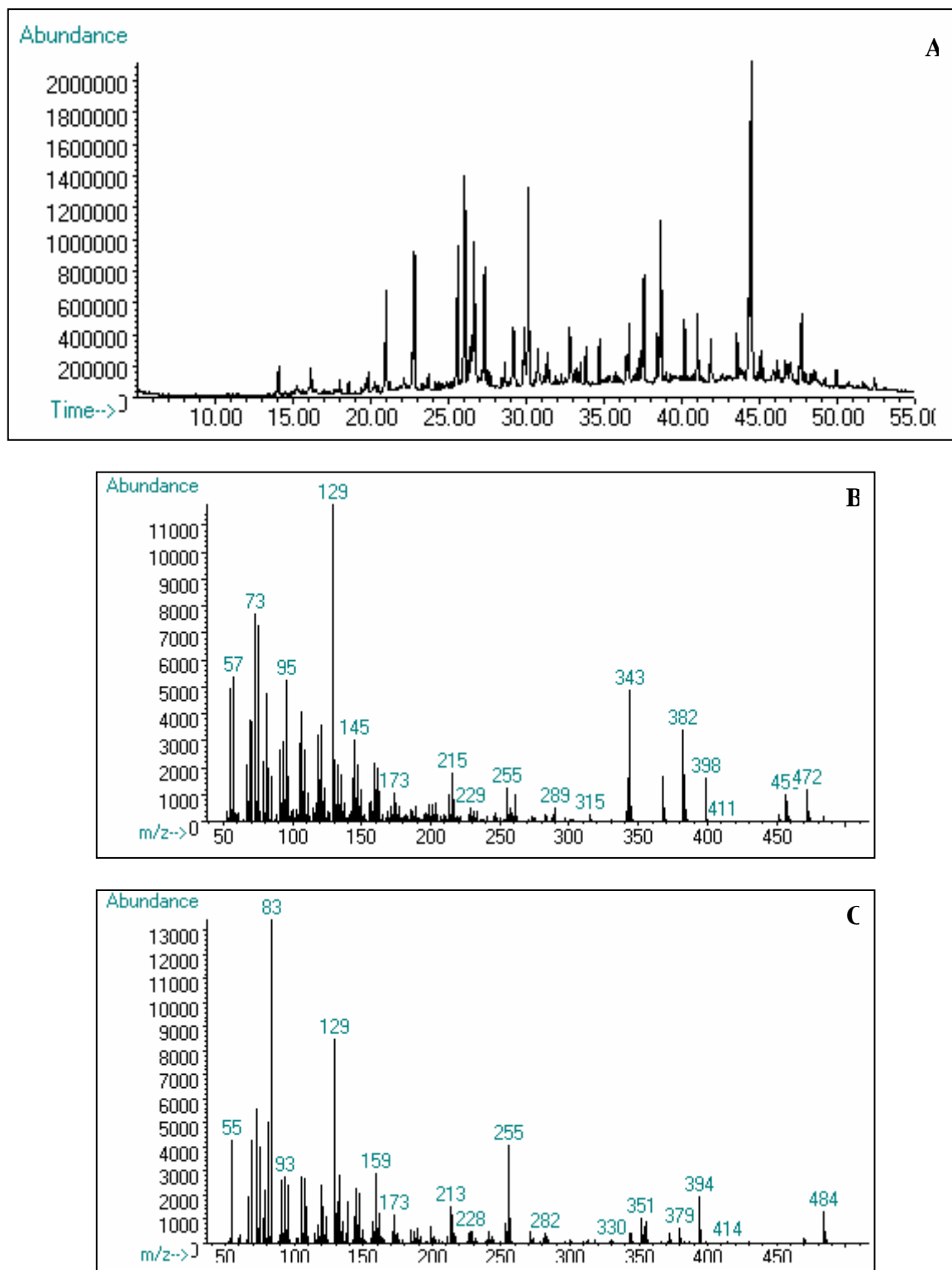


Figure II 5 : Exemple d'analyse de la composition en stérols.

A : Chromatogramme obtenu à partir d'un échantillon de MOP (avril 02, classe de taille [30-100]) ; TR : temps de rétention.

B : Spectre de masse du campesterol ; m/z : gamme de masse.

C : Spectre de masse du stigmasterol.

masse non identifiés dans la bibliothèque, il est possible d'identifier les ions issus de la fragmentation de la molécule, et, par conséquent, de connaître le type de composé (stanol, stérol en Δ^5 , Δ^{22} , Δ^4 , etc.)

Quantification par CPG

- Appareillage

- Chromatographe Chrompack modèle CP 9001
- Colonne capillaire : L = 30m, diamètre interne = 0,25mm, épaisseur du film = 0,25 μ m, phase stationnaire SOLGEL-1 (SGE)
- Injecteur : mode SPLIT
- Détecteur à ionisation de flamme (DIF)
- Gaz vecteur : Hélium
- Intégration : programme CP Maître (Chrompack)

- Conditions opératoires

- Conditions de température : injecteur = 300°C, détecteur = 260°C
- Programmation de température du four : de 60°C à 130°C à 30°C/min, puis de 130°C à 250°C à 5°C/min, et enfin de 250°C à 300°C à 2°C/min.

- Identification

L'identification des ST d'un échantillon est effectuée par comparaison du chromatogramme avec, d'une part, le chromatogramme d'un échantillon de cholestérol, et d'autre part, le chromatogramme du même échantillon injecté en CPG-SM.

- **Quantification**

La quantification des ST d'un échantillon est réalisée par calibration externe. Celle-ci consiste à injecter diverses concentrations d'un standard de cholestérol pur et sylilé (SIGMA). Connaissant les concentrations, et par conséquent les quantités de cholestérol injectées, une relation est faite entre la quantité de cholestérol injectée dans le chromatographe et la surface du pic correspondant à ce composé sur le chromatogramme.

2. Analyses des compositions pigmentaires

a. Extraction des pigments

L'extraction des pigments est réalisée selon une modification de la méthode de Zapata et al. (2000) mise au point en collaboration avec le Dr J.P. Aguer, Maître de Conférence au Laboratoire de Photochimie Moléculaire et Macromoléculaire de l'Université Blaise Pascal. Les filtres destinés aux analyses pigmentaires sont broyés dans 2ml de méthanol à 95%, l'extraction se déroule à l'obscurité à -20°C pendant 24h. L'extrait méthanolique est ensuite filtré à travers un filtre seringue en polypropylène de 25mm de diamètre et de 0,2µm de porosité afin d'enlever les cellules ainsi que les débris de filtre. Un aliquot (0,8ml) de l'extrait est récupéré puis mélangé à 0,2ml d'eau nanopure juste avant l'injection en HPLC. L'ajout d'eau permet d'éviter la distorsion de forme des premiers pics lors du passage des échantillons dans le chromatographe (Zapata & Garrido, 1991).

b. Appareillage

La séparation des pigments s'effectue sur une chaîne HPLC composée d'une chambre de mélange et d'un contrôleur Waters 600, d'un détecteur à barrettes de diodes Waters 2996 couplé avec un détecteur de fluorescence Waters 474 à l'aide d'une interface analogique Sat/In. L'ensemble de l'appareillage est piloté par le logiciel Waters Millenium.

La séparation des pigments nécessite l'utilisation d'une colonne Waters Symmetry® C₈ (150 x 4,6mm, taille de particule = 3,5µm, porosité = 100Å) protégée par une colonne de garde Waters Symmetry® C₈.

c. Conditions opératoires

La phase mobile est composée de deux mélanges de solvants, l'éluant A, composé de méthanol : acétonitrile : solution de pyridine aqueuse (0,25M, pH = 5,0) (50:25:25, v:v:v) et l'éluant B, constitué d'acétonitrile : méthanol : acétone (20:60:20, v:v:v).

Le gradient d'élution est décrit dans le tableau II 1 suivant :

Temps (min)	% A	% B
0	100	0
22	60	40
28	5	95
42	5	95
44	100	0

Tableau II 1 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des pigments.

d. Détection et identification

Un exemple de chromatogramme est représenté sur la figure II 6.

Les chlorophylles et les caroténoïdes sont détectés à l'aide du détecteur à barrettes de diodes programmé pour balayer les longueurs d'ondes comprises entre 350 et 750nm. Parallèlement, les chlorophylles et leurs dérivés sont détectés par fluorescence (excitation : 440nm, émission : 650nm).

Les différents composés sont identifiés en fonction de leur temps de rétention, de leur fluorescence et de leur spectre d'absorption. Les spectres obtenus pour chaque pigment sont

comparés avec ceux de standards du commerce (DHI, Sigma), ceux obtenus lors de l'analyse de cultures phytoplanctoniques réalisées au laboratoire, ou avec les spectres d'absorption disponibles dans la littérature.

e. Quantification

Les pigments sont quantifiés par calibration externe de l'HPLC à l'aide de standards de chlorophylles et de caroténoïdes disponibles dans le commerce (DHI, Sigma).

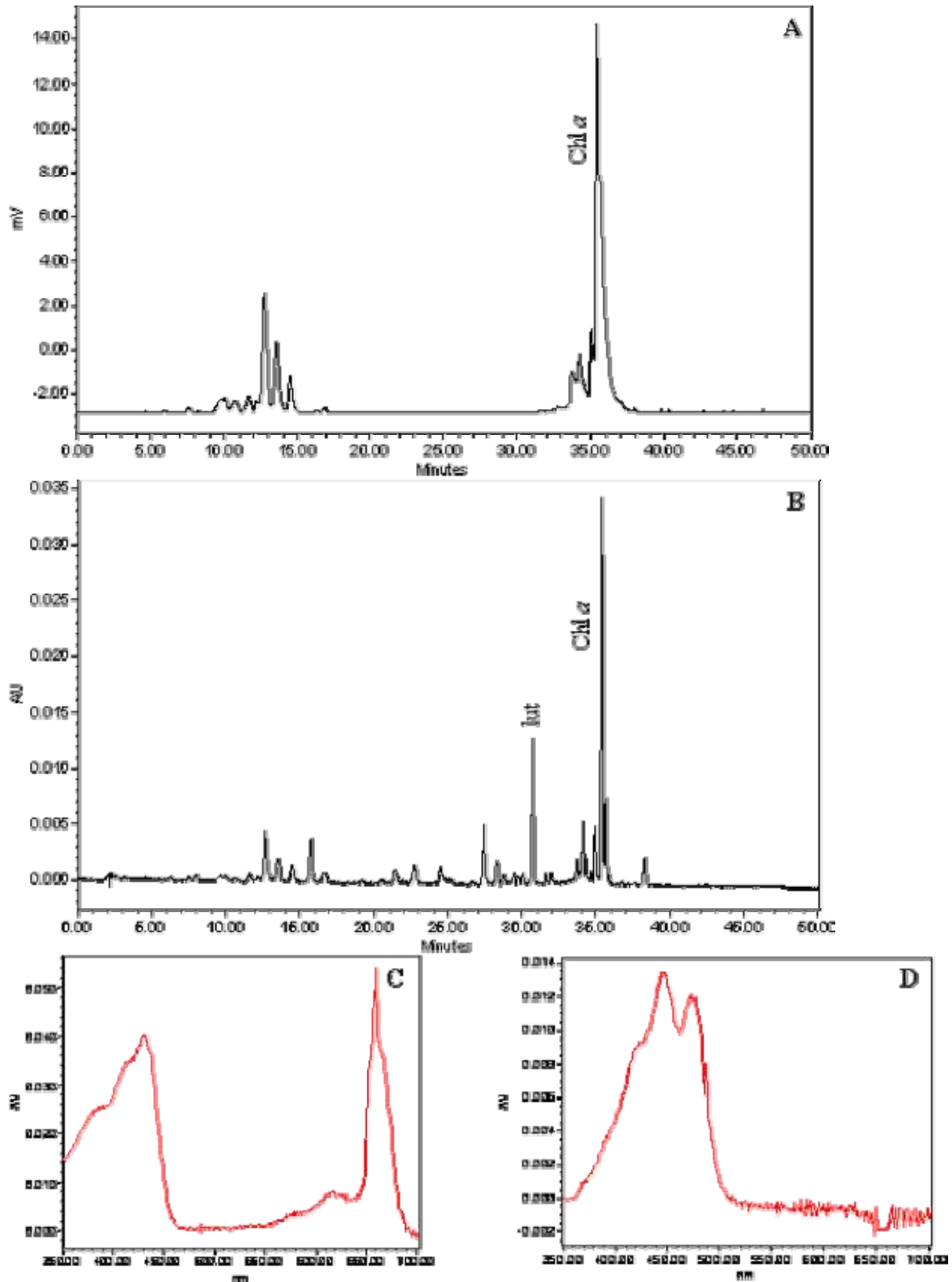


Figure II 6 : Exemple d'analyse de la composition en pigments. Chromatogrammes obtenus à partir d'un échantillon de MOP (novembre 02, classe de taille [30-100]).

A : Détection par fluorescence ;

B : Détection par le détecteur à barrettes de diodes à 440nm ;

C : Spectre d'absorption de la chlorophylle *a* (chl *a*) ;

D : Spectre d'absorption de la lutéine (lut).

B. Zooplancton

1. Composition des différentes classes de lipides

a. Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux est effectuée selon le protocole décrit sur la figure II 2. Le nombre d'individus nécessaires à l'extraction des lipides totaux de *Mixodiaptomus* est compris entre 1000 (CV-Ad.) et 2500 (N).

b. Séparation des classes de lipides par chromatographie sur couche mince (CCM)

La séparation des différentes classes de lipides chez *M. laciniatus* se fait grâce à l'utilisation de plaques de verre enduites d'un gel de silice (K6F silica gel 60Å, Whatman) et préalablement activées à 105°C pendant 20 minutes. Les extraits lipidiques totaux sont déposés en fines bandes à la base de la plaque de silice, ainsi que des standards de différentes classes de lipides.

Celle-ci est alors disposée dans une cuve dont l'atmosphère est saturée d'un mélange d'hexane:diéthyléther:méthanol:acide acétique (90:20:3:2, v:v:v:v). Une fois que la migration ascendante des solvants atteint le sommet de la plaque de silice, celle-ci est séchée puis disposée dans une seconde cuve contenant un mélange d'hexane et de diéthyléther (90:4, v:v). Quand la seconde migration est terminée, la plaque de silice est séchée, puis elle est disposée dans une cuve dont l'atmosphère est saturée d'iode.

Les différentes classes lipidiques présentes dans les échantillons sont alors identifiées par comparaison avec les standards préalablement déposés sur la plaque de silice, leur emplacement est délimité ; enfin, la silice correspondant à chaque classe lipidique recherchée (GL, PL, CE + ES, ST) est récupérée à l'aide d'une spatule.

La poudre correspondant à chacune des classes lipidiques subit alors 3 phases d'élution dans un mélange de chloroforme et de méthanol entrecoupées de centrifugations, et permettant alors de séparer la poudre de silice des classes de lipides.

c. Analyse des AG des PL et des GL

- Saponification et méthylation

Les AG contenus dans les PL et les GL préalablement séparés par CCM doivent être convertis en molécules plus volatiles pour être analysés en CPG. Ils subissent en conséquence une hydrolyse alcaline suivie d'une saponification, étapes qui modifient les AG sous forme de sels sodiques ; enfin, la méthylation transforme ces molécules sous forme d'EMAG (Fig. II 7).

- Séparation et identification des EMAG par CPG

La séparation et l'identification des EMAG provenant du zooplancton sont effectuées de la même façon que pour la MOP (paragraphe III A 1 c de ce chapitre).

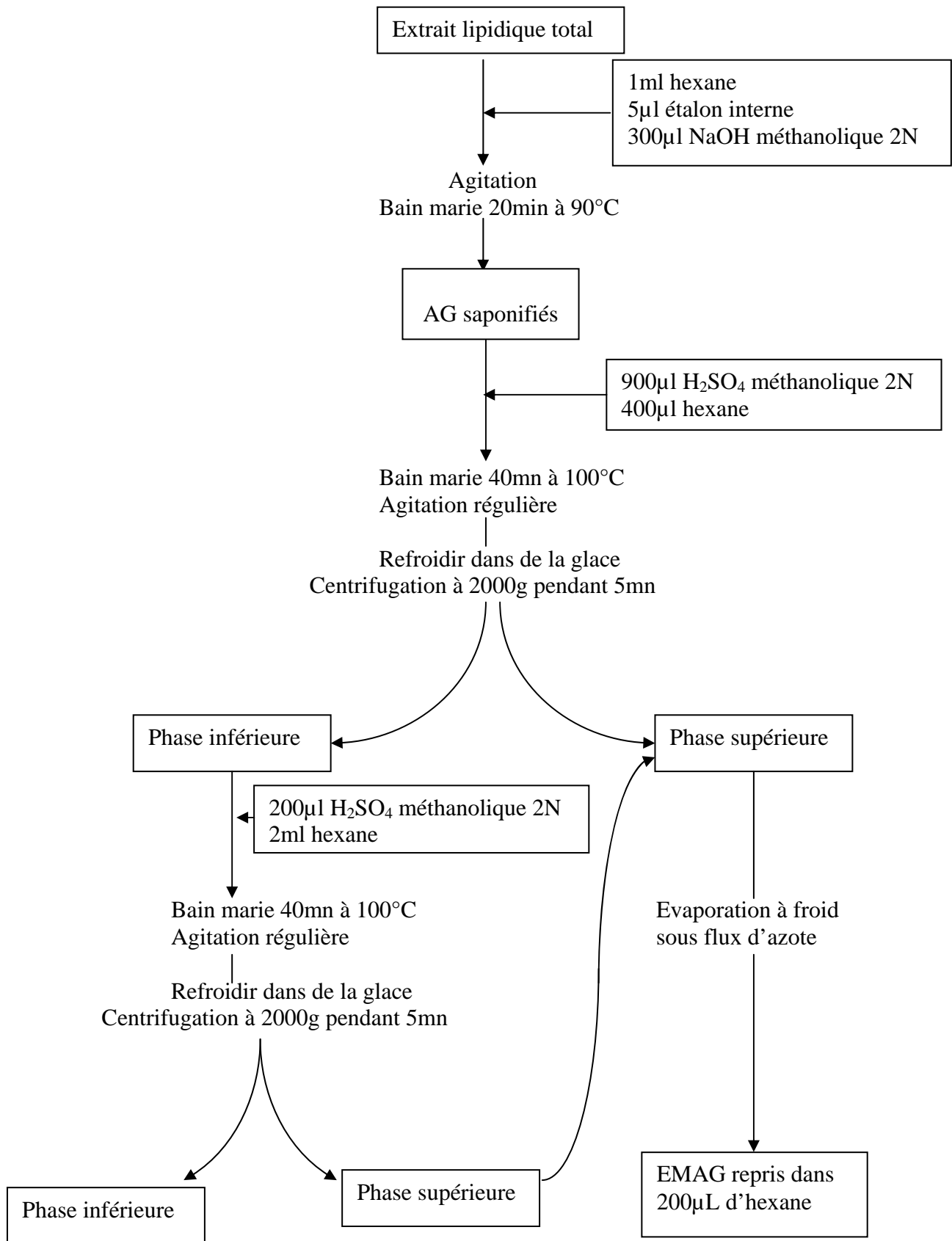


Figure II 7 : Préparation des esters méthyliques d'acides gras des PL et GL de *Mixodiaptomus*.

d. Analyse des AG des cérides

- Transméthylation des cérides et des esters de stérols

La séparation des différentes classes de lipides du zooplancton par CCM ne permet pas la différenciation des CE et des ES car ces deux classes de lipides ont tendance à co-éluer. La séparation des CE et des ES ainsi que la fragmentation des CE sous forme d'alcools gras et d'AG sont effectuées selon la méthode de Metcalfe & Schmitz (1961) modifiée par Morrison & Smith (1964) (Fig. II 8). Les extraits lipidiques provenant de la CCM sont chauffés dans un bain marie en présence de benzène et de boron trifluoride méthanol ($\text{BF}_3\text{-MeOH}$ à 7%), puis plusieurs lavages successifs au benzène et à l'eau entrecoupés de centrifugations permettent de séparer les esters de stérols des alcools gras et acides gras (sous forme d'EMAG) des CE.

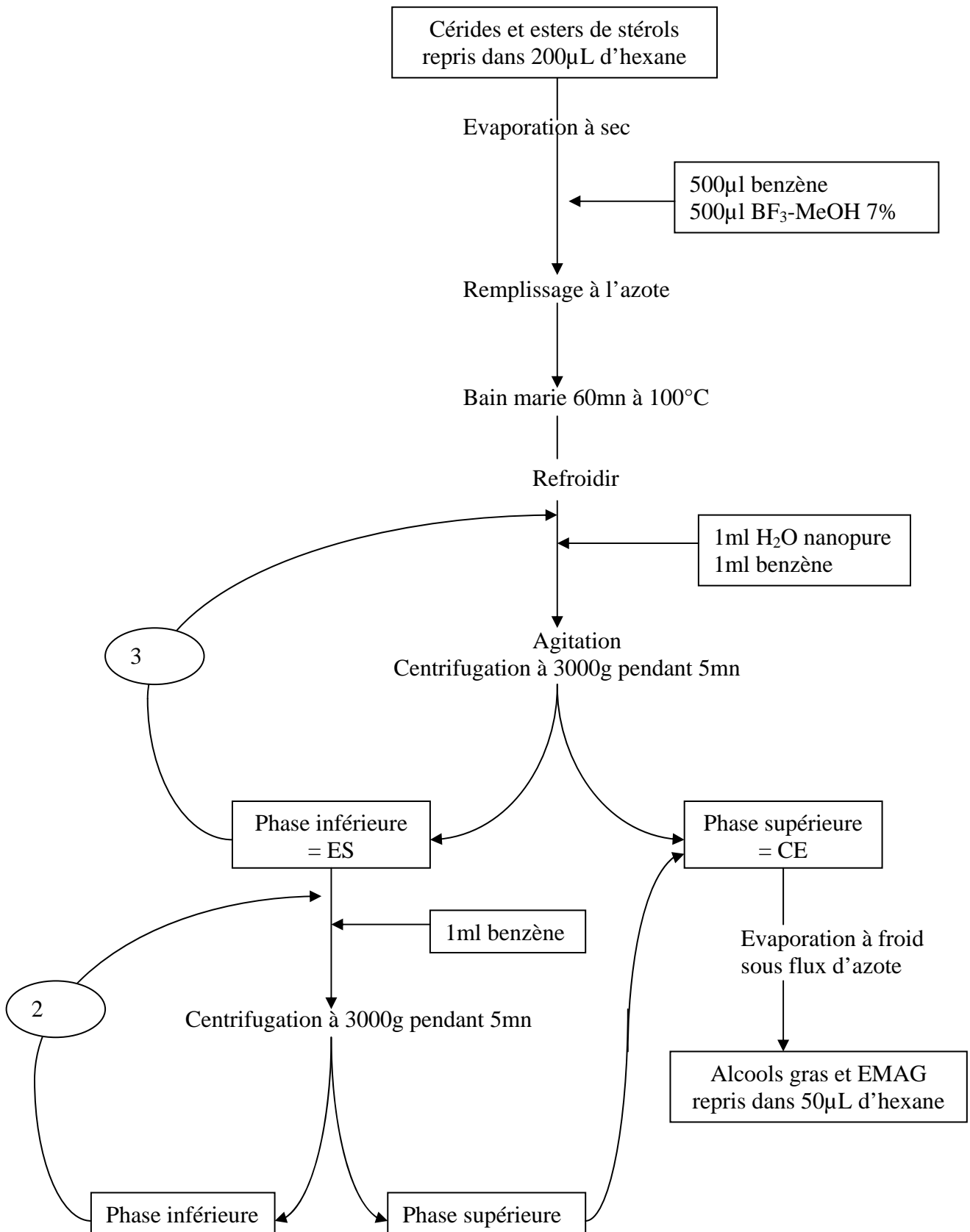


Figure II 8 : Transméthylation des cérides (CE) et des esters de stérols (ES) (d'après Metcalfe & Schmitz, 1961 ; modifié par Morrison & Smith, 1964)

- Séparation des EMAG et alcools gras par chromatographie sur couche mince

Les EMAG et les alcools gras composant les CE sont séparés par une CCM dont la cuve est saturée du mélange de solvants hexane:diéthyléther:acide acétique (85:15:1, v:v:v). Après migration complète des solvants, de la difluoroscéine est vaporisée en spray sur la plaque de verre, puis celle-ci est disposée pendant 5 minutes dans une cuve dont l'atmosphère est saturée d'ammoniac. La visualisation des taches correspondant aux alcools gras et aux EMAG se fait sous une lumière UV.

Les EMAG et alcools gras sont alors récupérés par grattage des taches correspondantes à l'aide d'une spatule, puis sont séparés de la poudre de silice par lavages successifs au chloroforme entrecoupés de centrifugations.

- Séparation et identification des EMAG par CPG

Après avoir récupéré les EMAG constituant les CE par CCM, 5µl d'étalon interne (23:0 sous forme d'EMAG) sont ajoutés aux échantillons qui sont alors prêts à être injectés en CPG.

La méthode utilisée en CPG pour séparer et identifier ces composés est la même que celle utilisée pour les EMAG des PL et des GL du zooplancton ou des lipides totaux de la MOP (paragraphe III A 1 c).

e. Analyse des ST

La méthode d'analyse des ST extraits du zooplancton, comprenant une silylation, puis une séparation et une identification des composés présents par CPG-SM et CPG est identique à celle décrite pour la MOP (paragraphe III A 1d et e de ce chapitre).

2. Compositions lipidiques

a. Extraction des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux est identique à celle décrite paragraphe III B 1 a.

b. Appareillage

La séparation des différentes classes de lipides est réalisée à l'aide d'une chaîne HPLC associée à un détecteur par diffusion de lumière (HPLC-DDL). L'équipement est composé d'une pompe et d'un contrôleur Waters 600 couplés à un détecteur DDL 21 (Eurosep Instruments) à l'aide d'une interface Sat/In. L'ensemble est géré par le logiciel Waters Millenium.

La colonne utilisée pour la séparation des classes de lipides est une Waters Spherisorb® S5 CN en phase normale (150 x 4,6mm, taille de particule = 5µm) protégée par une colonne de garde du même type.

c. Conditions opératoires

La phase mobile est composée de quatre éluants : Le premier (A) est de l'hexane ; le second (B) est du t-Butyl méthyl éther ; le troisième (C) est un mélange de 2-propanol:chloroforme:acide acétique (82:20:0,01, v:v:v) ; le quatrième (D) est composé de 2-propanol:eau:triéthylamine (47:47:6, v:v:v).

Le gradient d'élution est décrit dans le tableau II 2 ci-après :

Temps (min)	% A	% B	% C	% D	débit (ml/min)
0	98	2	0	0	1
3	98	2	0	0	1
4	90	10	0	0	1
6	85	15	0	0	1
9	83	17	0	0	1
12	83	17	0	0	1
14	80	20	0	0	1
15	50	50	0	0	1
17	50	50	0	0	1
20	45	2	53	0	1,5
22	42	1	52	5	1,5
29	37	1	52	10	1,5
31	37	1	52	10	1,5
34	40	0	52	8	1,5
35	98	2	0	0	1

Tableau II 2 : Gradient d'élution utilisé pour la séparation des classes de lipides.

d. Détection et identification

Les différentes classes de lipides détectées sont identifiées à partir de leur temps de rétention et comparées à des standards obtenus dans le commerce (Sigma, Supelco). Un exemple de chromatogramme est représenté sur la figure II 9.

e. Quantification

Pour chaque classe lipidique est établie une courbe de calibration externe réalisée à l'aide de standards disponibles dans le commerce (Sigma, Supelco).

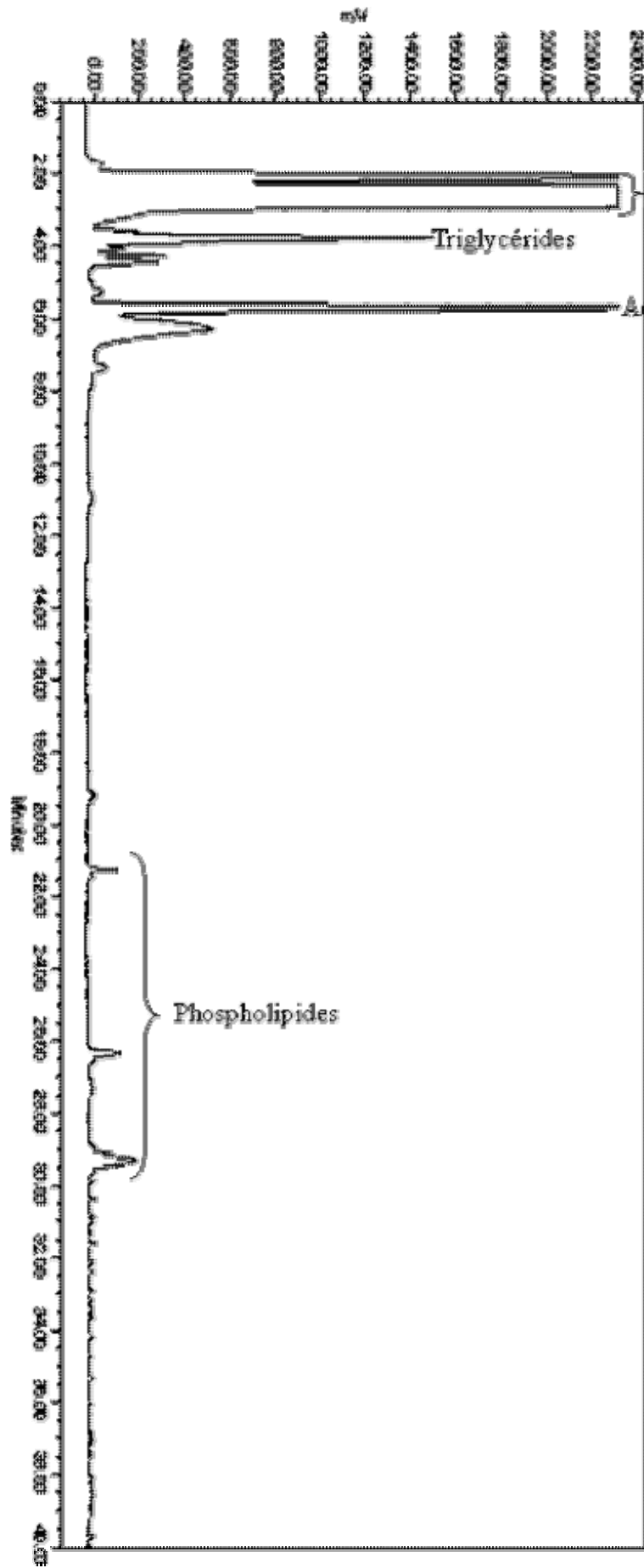


Figure II 9 : Exemple d'analyse des compositions lipidiques de *Mixodiaptomus laciniatus* (CV femelles de décembre 01).

3. Compositions pigmentaires

Le nombre d'individus nécessaires à l'extraction des pigments du zooplancton dépend du stade de développement, il est compris entre 500 (CV-Ad.) et 2000 (N).

La méthode choisie est identique à celle utilisée pour extraire, identifier et quantifier les pigments de la MOP (paragraphe III A 2 de ce chapitre).

Nous avons choisi d'estimer la sélection des différents stades de développement de *Mixodiaptomus* sur chaque classe d'algues phytoplanctoniques, de la même manière que plusieurs études antérieures sur les copépodes (Cottonnec et al., 2001 ; Cottonnec, 2001), à l'aide de l'indice de sélectivité d'Ivlev (Ivlev, 1961) :

$$E = (r_i - p_i) / (r_i + p_i)$$

Où : r_i = proportion relative du pigment i dans les copépodes

p_i = proportion relative du pigment i dans la MOP

Les valeurs de E obtenues pour chaque pigment marqueur donnent alors une estimation du comportement alimentaire du copépode vis-à-vis de la classe d'algue considérée, à savoir :

$-0,25 < E$: évitement ou rejet ;

$-0,25 < E < +0,25$: nutrition non sélective ;

$E > +0,25$: préférence alimentaire, nutrition sélective.

CHAPITRE III :

CONTEXTE DE L'ETUDE

I. Description du site d'étude

Le lac de La Godivelle-d'en-Haut est localisé sur le plateau du Cézallier (Puy-de-Dôme), à 1239m d'altitude (latitude : 45°23'19" N ; longitude : 2°55'08" E). Ce lac de cratère est pratiquement circulaire (Fig. III 1) ; il est alimenté uniquement par les précipitations directes ou s'écoulant du bassin versant dont la surface est réduite et non anthropisée (prairie d'altitude). Ses caractéristiques morphométriques sont résumées dans le tableau III 1. Le lac de La Godivelle-d'en-Haut est dimictique (Meybeck et al., 1975) et des études antérieures l'ont considéré comme oligotrophe (Persoone et al., 1968 ; Rioual, 2000).

II. Paramètres physico-chimiques

1. Température

Au cours de notre suivi, le lac de La Godivelle-d'en-Haut est caractérisé par des eaux froides (Fig. III 2), avec des températures de surface n'excédant pas 17°C en été, et une température de la colonne d'eau moyenne sur notre période d'étude de 10,2°C. Une faible stratification thermique se met en place en période estivale (juin - juillet), jusqu'au mois de septembre. En dehors de cette période, la masse d'eau apparaît comme relativement instable, avec des températures assez homogènes le long de la colonne d'eau, ceci étant probablement dû aux forts vents rencontrés sur le site.

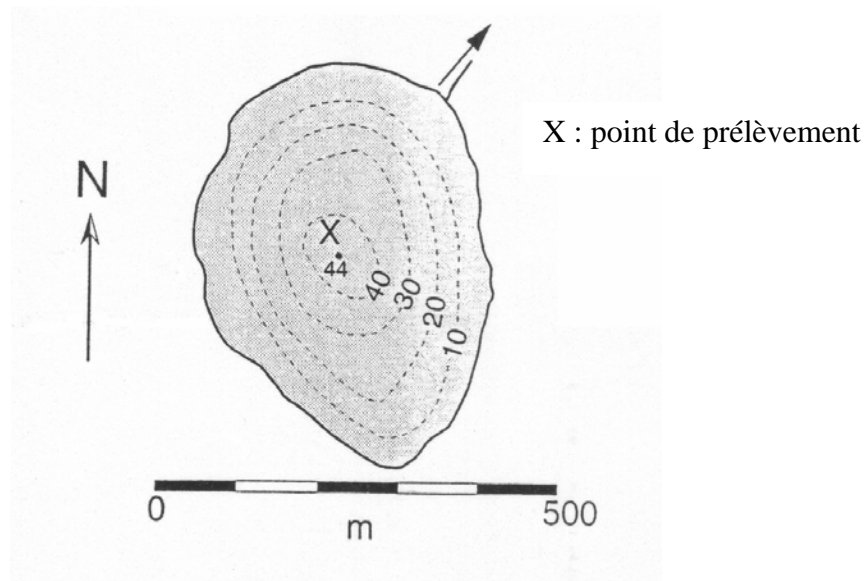


Figure III 1 : Bathymétrie du lac de La Godivelle-d'en-Haut (redessiné d'après Delebecque, 1898)

Altitude	1239 m
Superficie	13,8 ha
Volume d'eau	$2,74.10^6 \text{ m}^3$
Longueur	500m
Largeur	350 m
Profondeur maximale	44 m
Surface du bassin versant	13,4 ha

Tableau III 1 : Caractéristiques morphométriques du lac de La Godivelle-d'en-Haut

2. Transparence de l'eau

La transparence de l'eau, mesurée par la profondeur de disparition du disque de Secchi (Fig. III 3) varie peu jusqu'au mois de juin (entre 6,5 et 9,5m). Dans la littérature, les études antérieures concernant ce même lac (Meybeck et al., 1975 ; Rioual, 2000) rapportent des valeurs de disparition du disque de Secchi comprises entre 5,8 et 12,4 m. Aucune mesure n'a pu être réalisée au mois de novembre du fait de mauvaises conditions météorologiques.

La période estivale est caractérisée par une phase d'eaux claires en juillet, puis par une diminution de la transparence de l'eau au mois de septembre.

3. Chlorophylle *a*

Les concentrations en chlorophylle *a* (chl *a*) dans la colonne d'eau comprise entre 0 et 20m et déterminées à partir des analyses pigmentaires réalisées en HPLC (Fig. III 4) sont très faibles pour la période étudiée (moyenne = 0,34 µg/l), mais elles montrent de très importantes variations temporelles. En effet, la teneur en chl *a* est de l'ordre de 0,05µg/l au printemps et en été, puis elle atteint 0,19 et 1,81µg/l respectivement en septembre et novembre. La concentration en chl *a* étant un indicateur de la biomasse phytoplanctonique, ses variations saisonnières laissent suggérer un important bloom phytoplanctonique à l'automne (septembre et novembre).

4. Sels nutritifs

Les nutriments azotés (NH_4^+ , NO_3^{2-} , NO_2^-) sont présents en faibles concentrations dans le milieu (Tab. III 2) ; les teneurs maximales sont atteintes au printemps (avril). Ces valeurs sont en accord avec celles reportées par Rioual en 2000, qui montre que les concentrations en sels nutritifs de ce lac sont largement inférieures à celles qu'il a observé pour de nombreux autres lacs du Massif Central.

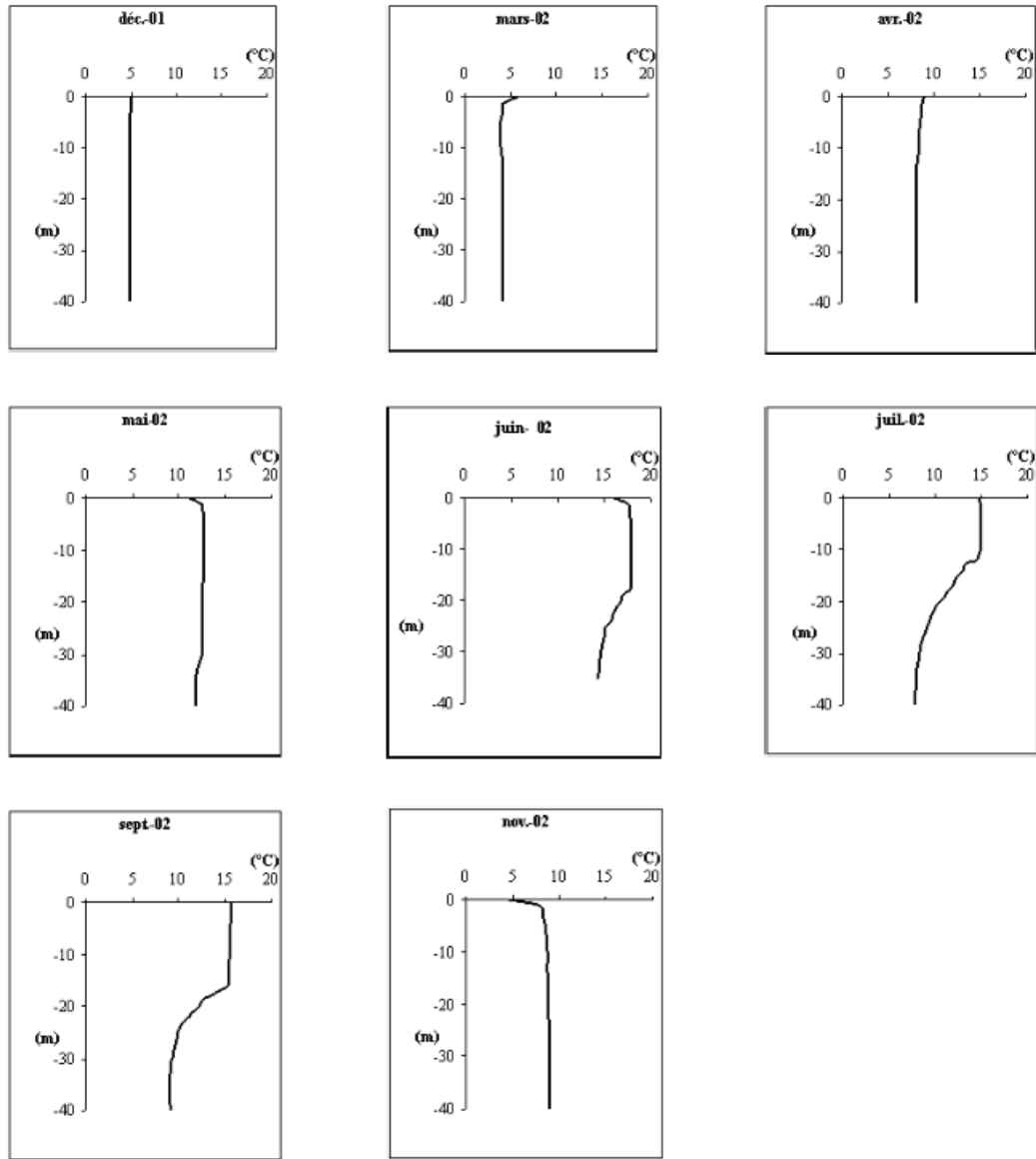


Figure III 2 : Variations saisonnières de l'évolution de la température le long de la colonne d'eau.

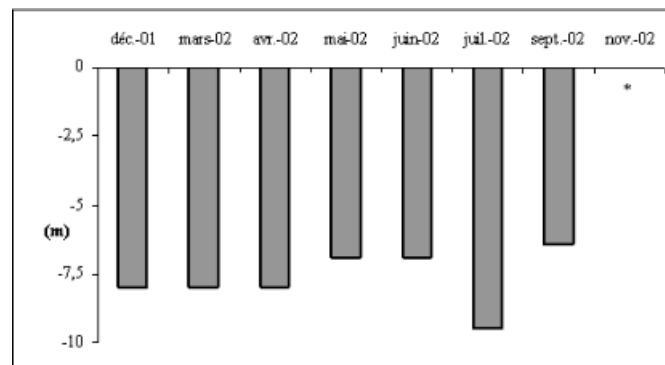


Figure III 3 : Variations saisonnières de la profondeur de disparition du disque de Secchi.
*: donnée manquante.

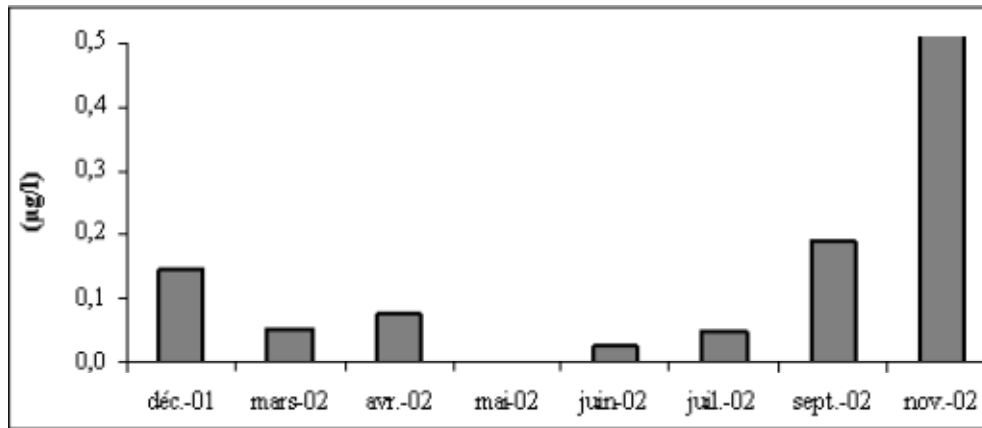


Figure III 4 : Variations saisonnières des concentrations en chlorophylle a (µg/l) dans la colonne d'eau comprise entre 0 et 20m de profondeur.
* : donnée manquante.

	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
SiO₂	0,100	-	0,130	0,160	0,100	0,180	0,370	0,110
NO₃⁻	-	-	0,570	0,390	0,200	0,100	0,120	0,110
NO₂⁻	-	-	0,018	0,010	-	-	-	0,011
NH₄⁺	0,020	0,040	0,040	-	-	-	-	-

Tableau III 2 : Variations saisonnières des concentrations en sels nutritifs (mg/l) : silice (SiO₂), nitrates (NO₃⁻), nitrites (NO₂⁻), ammonium (NH₄⁺).
(-) : concentration inférieure à la limite de détection.

III. Dynamique des populations zooplanctoniques

La densité des organismes zooplanctoniques (Fig. III 5) correspond à des prélèvements effectués entre 0 et 30m de profondeur (chapitre II), elle est donc assez faible en comparaison avec celle relevée dans d'autres lacs de montagne oligotrophes tels que le lac de Port-Bielh (Rey & Capblancq, 1975) dans les Pyrénées ou celui de La Caldera en Espagne (Villar Argaiiz et al., 2002). Elle est en moyenne de 1488 ind./m³ sur la période d'étude, les densités les plus fortes ayant été observées lors du dégel du lac (mars) et en juillet. La structure de la communauté zooplanctonique est relativement simple (Fig. III 6) ; elle est représentée à plus de 90% en terme d'abondance par le copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus*, excepté aux mois de juin et juillet. Pendant cette période estivale se développent des cladocères, essentiellement représentés par *Daphnia longispina* et *Ceriodaphnia quadrangula*, qui atteignent une densité maximale de 850 ind./m³ au mois de juillet. Quelques individus du cladocère *Diaphanosoma brachyurum* ont également été observés à cette période, à des abondances très faibles (moins de 10 ind./m³). Contrairement aux cladocères, les rotifères et les copépodes cyclopoïdes sont présents toute l'année à des densités comprises entre moins de 1 et 635 ind./m³ pour les rotifères et entre 3 et 231 ind./m³ et pour les cyclopoïdes.

M. laciniatus est donc la seule espèce zooplanctonique présente à des abondances relativement importantes pendant toute la période d'étude. Sa densité maximale a été relevée en mars (8113 ind./m³), les valeurs minimales ayant été observées en novembre (190 ind./m³). Pendant toute la période d'étude, la population est essentiellement représentée par les stades copépodites et adultes. Ce n'est qu'à partir du mois d'avril qu'apparaissent les stades nauplii, qui sont présents dans le milieu jusqu'au mois de juin, et dont la densité est maximale en mai (273 ind./m³).

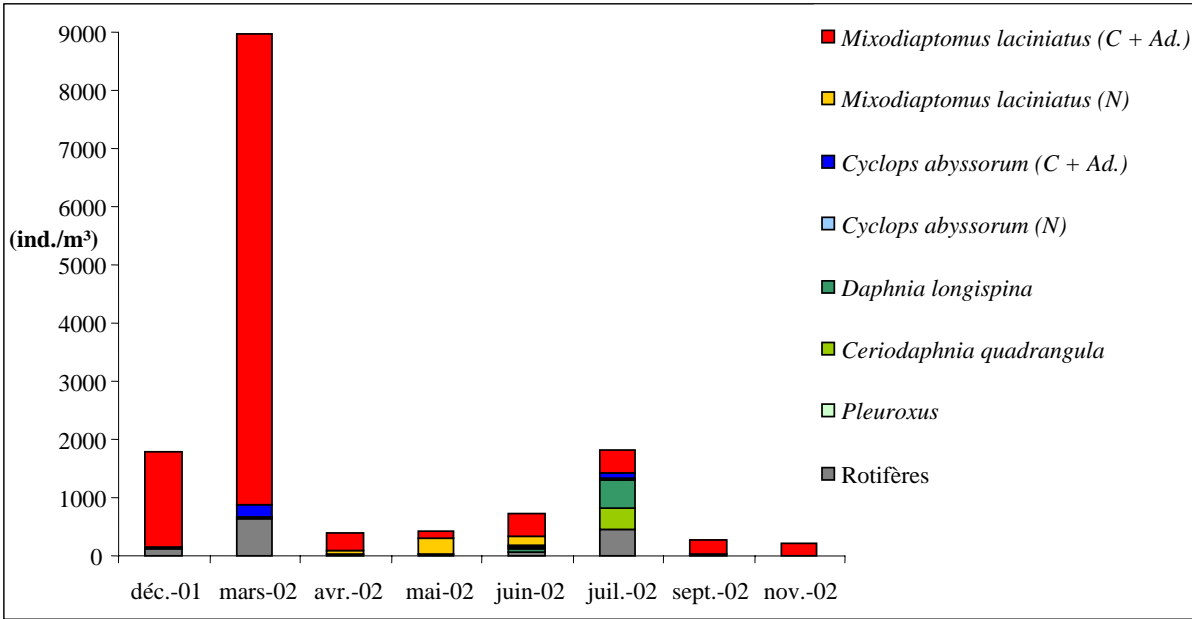


Figure III 5 : Variations saisonnières de la densité (ind./m³) des organismes zooplanctoniques.
N : nauplii ; C : copépodites ; Ad. : adultes.

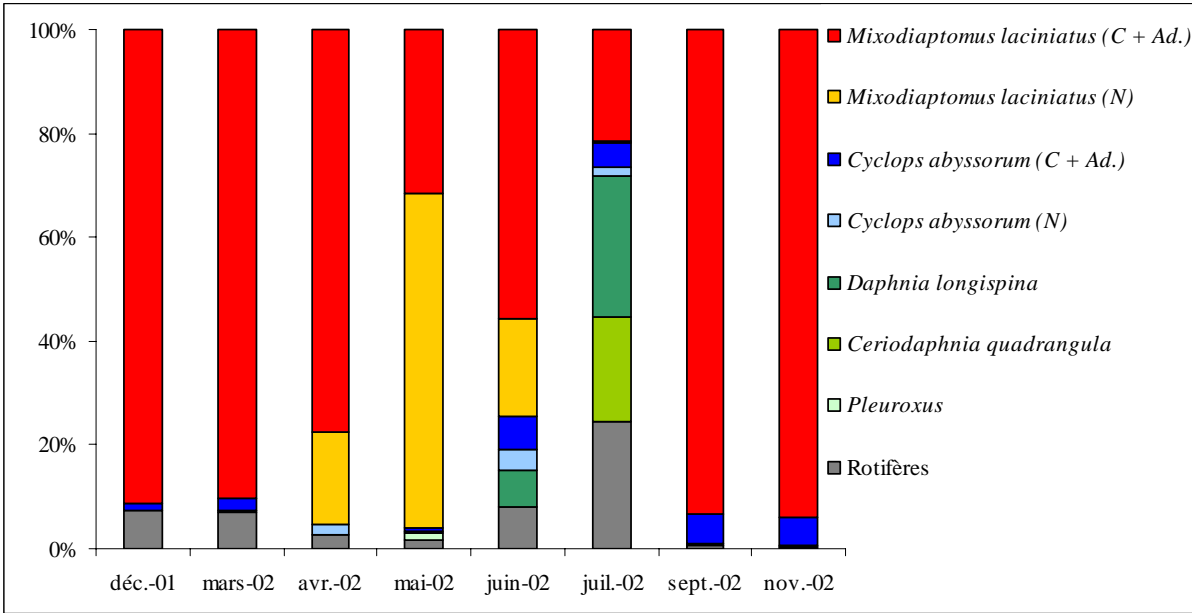


Figure III 6 : Variations saisonnières de l'abondance relative des organismes zooplanctoniques.
N : nauplii ; C : copépodites ; Ad. : adultes.

IV. *Mixodiaptomus laciniatus*

1. Cycle biologique

La population de *M. laciniatus* (Fig. III 7, Tab. III 3) passe l'hiver sous la forme de stades copépodites V (CV). Cette génération se métamorphose en stade adulte mature sexuellement après le dégel, entre mars et avril, et disparaît du milieu en juillet. La reproduction printanière conduit à l'apparition d'une nouvelle génération dès le mois d'avril sous la forme des premiers stades nauplii (NI). Celle-ci se développe en stades NII-NIII en mai, CII en juin, CIV en juillet, puis en CV en septembre.

Pendant la période d'étude, nous avons donc pu suivre deux générations : La première (2001) est représentée par des stades copépodites IV et V en décembre et en mars ; ceux-ci se reproduisent en avril, période à laquelle ils sont alors représentés par des stades adultes, et disparaissent du milieu en été (juillet). La deuxième génération (2002) apparaît en avril sous la forme des premiers stades nauplii ; elle se développe pendant toute la saison chaude et passe l'hiver sous la forme des stades CV et adultes.

Le cycle biologique de *M. laciniatus* est donc de type univoltin, la population passant l'hiver sous la forme des derniers stades copépodites.

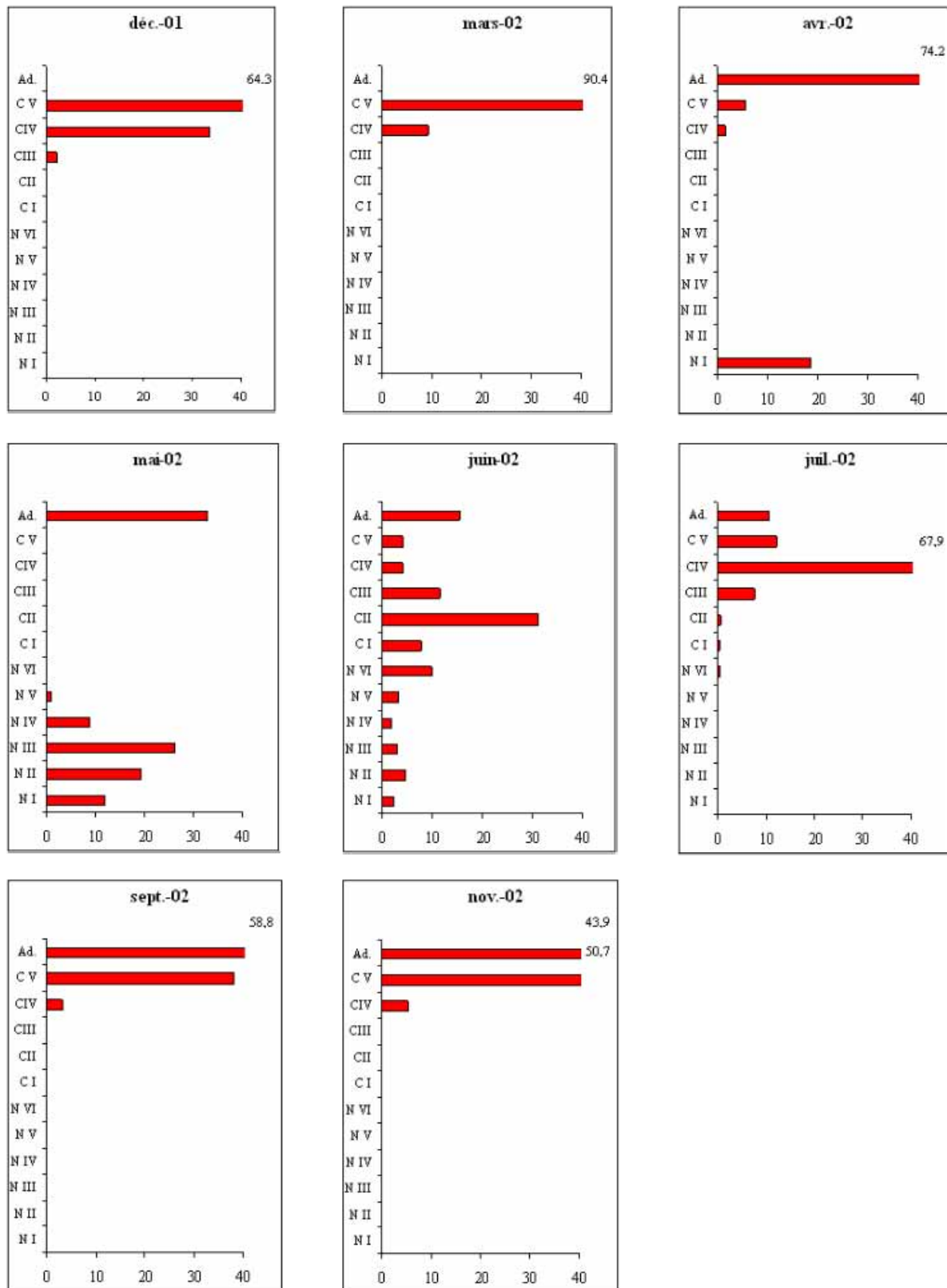


Figure III 7 : Abondance relative (%) des différents stades de développement de *Mixodiaptomus laciniatus*.
N : nauplii ; C : copépodites ; Ad. : adultes.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
NI	-	-	71,2	48,2	12,1	-	-	-
NII	-	-	-	78,6	25,2	-	-	-
NIII	-	-	-	106,9	16,8	-	-	-
NIV	-	-	-	35,7	10,6	-	-	-
NV	-	-	-	3,7	18,0	-	-	-
NVI	-	-	-	-	53,8	1,9	-	-
CI	-	-	-	-	42,0	1,9	-	-
CII	-	-	-	-	168,5	2,5	-	-
CIII	34,6	-	-	-	62,5	29,8	-	-
CIV	548,6	753,5	5,9	-	22,4	266,7	8,1	10,3
CV ♂	493,7	3686,9	17,7	-	11,5	27,4	47,9	55,3
CV ♀	554,3	3646,5	3,7	-	11,5	20,8	48,2	40,7
Ad. ♂	-	-	104,8	65,3	21,4	12,7	85,5	42,3
Ad. ♀	-	26,0	179,0	69,0	62,5	28,9	63,1	41,0

Tableau III 3 : Densité (ind./m³) des différents stades de développement de *Mixodiaptomus laciniatus*.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
sex-ratio (♂/♀)	-	-	0,59	0,95	0,34	0,44	1,35	1,03
% ♀ov.	-	-	64	57	50	0	0	1
taille de ponte	-	-	3,46	1,83	1,35	0,00	0,00	4,00

Tableau III 4 : Sex-ratio, proportion de femelles ovigères et taille de ponte chez *Mixodiaptomus laciniatus*.

% ♀ov. : Proportion de femelles ovigères (en pourcentage du nombre total de femelles) ;
 Taille de ponte : Nombre moyen d'œufs par femelle ovigère.

2. Reproduction

Le sex-ratio (Tab. III 4) montre une variabilité importante sur notre période d'étude. Chez la première génération (2001) qui se reproduit au printemps et disparaît du lac en juillet, la proportion de femelles est supérieure à celle des mâles. La génération suivante (2002), qui commence à se métamorphoser en stades CV en septembre, montre un sex-ratio supérieur à 1, les mâles dominant la population à cette période.

Concernant l'activité reproductrice du copépode, celle-ci a lieu au printemps. En effet, la proportion de femelles ovigères (par rapport au nombre total de femelles adultes) et la taille de ponte (nombre moyen d'œufs portés par les femelles ovigères) sont plus élevées à cette période de l'année (Tab. III 4). En fait, la reproduction est étalée entre avril et juin car des femelles ovigères sont présentes dans le milieu à cette période, mais celle-ci est maximale en avril, période à laquelle la proportion de femelles ovigères et les tailles de ponte sont les plus importantes. Ceci explique pourquoi les premiers stades nauplii (NI – NII) sont présents dans le lac sur une période aussi longue (Tab. III 3). Au mois de novembre, la nouvelle génération est composée d'une très faible proportion de femelles ovigères (1%) ; la maturation sexuelle d'une partie de la population de calanoïdes en novembre est probablement liée aux conditions thermiques plus favorables à cette période (température moyenne de la colonne d'eau = 8,6°C).

V. Discussion

De par sa situation géographique et l'altitude à laquelle il est situé, le lac de La Godivelle-d'en-Haut subit des conditions météorologiques particulières (vent important, températures basses) qui peuvent expliquer le brassage quasi permanent et une température relativement froide une bonne partie de l'année. De plus, les concentrations en nutriments, en

chlorophylle *a* ainsi que les valeurs de transparence de l'eau sont caractéristiques d'un milieu oligotrophe, voire ultra-oligotrophe (OCDE, 1982).

Ces conditions abiotiques et biotiques particulières sont peu favorables au développement du zooplancton et expliquent les faibles densités de microcrustacés rencontrées tout au long de l'étude. *M. laciniatus* est l'espèce dominante, probablement parce qu'elle a su développer les stratégies adaptatives lui permettant de survivre dans ce milieu assez contraignant. Ce copépode, fréquemment rencontré dans les lacs de montagne oligotrophes et ultra-oligotrophes du Sud de l'Europe (Jersabek et al., 2001), réalise ici un cycle biologique de type univoltin au cours duquel la population mature sexuellement et se reproduit dès le dégel du lac. Les premiers stades nauplii apparaissent à cette période et le développement larvaire se réalise du printemps à l'automne, afin que les derniers stades copépodites passent l'hiver et se reproduisent au printemps suivant.

La production ovigère printanière, de l'ordre de 3,5 œufs/femelle, est faible comparativement à celle observée dans d'autres écosystèmes. En effet, Eichhorn (1957) et Cruz-Pizarro (1983) ont observé que cette même espèce présente, dans des lacs de montagne, des tailles de ponte comprises entre 5 et plus de 20 œufs par femelle ovigère. Cependant, ce paramètre est connu pour être très variable et il est donc difficile de comparer les valeurs que nous avons obtenu au cours de notre étude avec celles de la littérature. On sait notamment que, chez une même espèce, deux populations peuvent présenter des tailles de ponte différentes, et, au sein du même écosystème, la taille de ponte peut varier d'une année à l'autre (Hutchinson, 1967). En effet, la taille de ponte dépend de nombreux facteurs tels que la taille des femelles (Corkett & McLaren, 1969), la température (Abou Debs & Nival, 1983 ; Huntley & Lopez, 1992 ; Hirche et al., 1997) ou encore la qualité et la quantité de nourriture (Corkett & McLaren, 1969 ; Mullin & Brooks, 1970 ; Hirche, 1990). Ainsi, Comita (1956) et Comita & Anderson (1959) ont montré dans un lac Arctique et dans le lac Washington, que la taille de ponte de

Limnocalanus johanseni et de *Diaptomus ashlandi* dépendait essentiellement de la concentration en chlorophylle *a* du milieu au cours des deux semaines précédant la formation des œufs.

Concernant le sex-ratio, certains auteurs considèrent qu'il est supérieur à 1 lorsque la population est présente en densité importante, et inférieur à 1 dans le cas contraire (Pirocchi, 1947 ; Ravera, 1955). Il semble également que les femelles dominent en l'absence de compétiteurs zooplanctoniques, alors que les mâles dominent lorsque la structure trophique de la communauté est plus complexe, c'est-à-dire en présence de compétiteurs utilisant les mêmes ressources nutritives (Ferrari, 1971). D'autres études (Coker, 1933 ; Margalef, 1955 ; Miracle, 1976) ont suggéré que le sex-ratio pouvait être influencé par la température, les mâles étant favorisés à des périodes plus chaudes. Dans notre étude, les femelles dominent d'avril à juillet, c'est-à-dire en période de reproduction ; la densité de cette génération est élevée en avril (284 ind./m³ dont 63% de femelles), puis chute après la reproduction pour atteindre une valeur de 42 ind./m³ en juillet (dont 69% de femelles). Il faut donc considérer que les durées de vie de chaque sexe sont différentes. Les femelles survivant plus longtemps après la reproduction, elles peuvent assurer la ponte d'œufs fertiles sur une période plus importante (Gurney, 1929 ; Roen, 1957 ; McLaren, 1969).

Malgré sa capacité à produire des œufs de durée dans certaines conditions (Champeau, 1970), *M. laciniatus* ne produit ici que des œufs subitaneés qui éclosent dans les 5 jours suivant leur libération par les femelles. Il n'y a pas de production d'œufs de durée en automne, car la population ne présente que peu de femelles ovigères à cette période (Tab. III 4). Ceci a aussi été observé chez la même espèce dans deux écosystèmes similaires des Pyrénées et d'Espagne (Rey & Capblancq, 1975 ; Cruz-Pizarro, 1983).

Le lac de La Godivelle-d'en-Haut est donc un lac de montagne froid et oligotrophe, peu favorable à la production zooplanctonique. La seule espèce de microcrustacé

zooplanctonique pouvant se développer efficacement est le calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus*. Dans ce contexte de faible production primaire et de conditions environnementales contraignantes, il est intéressant de déterminer quelles stratégies adaptatives a développé ce copépode pour pouvoir assurer un cycle biologique complet.

CHAPITRE IV :
ENVIRONNEMENT TROPHIQUE

I. Composition taxonomique de la MOP [0,7-100]

Afin de mieux comprendre les interactions existant entre *Mixodiaptomus laciniatus* et son environnement trophique, nous avons entrepris une analyse de la MOP fractionnée en classes de taille du lac de La Godivelle-d'en-Haut. La stratégie d'échantillonnage a donc été déterminée en fonction du cycle biologique du copépode entre décembre 2001 et novembre 2002. Il faut également noter que la MOP correspond à des échantillons intégrés sur la colonne d'eau comprise entre 0 et 20m de profondeur (chapitre II) ; en effet, c'est dans cette zone du lac que les microcrustacés zooplanctoniques se rencontrent le plus fréquemment, mais également qu'ils se nourrissent (Rey & Capblancq, 1975 ; Pourriot & Champ, 1982).

1. Composition taxonomique de la MOP [0,7-100]

Au cours de la période d'étude, la biomasse microbienne totale montre d'importantes variations saisonnières. En effet, celle-ci est inférieure à 230 $\mu\text{g C/l}$ de décembre à juillet, puis elle s'accroît de façon importante en septembre et novembre, période à laquelle elle est supérieure à 900 $\mu\text{g C/l}$ (Tab. IV 1).

a. Microalgues phytoplanctoniques

Sur la période étudiée, les algues phytoplanctoniques représentent entre 20,4 et 62,8% de la biomasse microbienne totale, pour une biomasse moyenne de 69,8 $\mu\text{g C/l}$ (Fig. IV 1). Les principaux groupes représentés sont les cryptophycées, les chlorophycées, les dinophycées et les cyanobactéries.

Les cryptophycées, principalement représentées par les genres *Cryptomonas* et *Rhodomonas*, constituent entre 0,6 (novembre) et 21% (juin) de la biomasse microbienne totale, pour une moyenne de 6,9% sur la période d'étude. Leur biomasse moyenne est de 11,2 $\mu\text{g C/l}$, elle est

maximale entre juin et septembre (14,1 à 26,6 $\mu\text{g C/l}$) et minimale en décembre (2,8 $\mu\text{g C/l}$).

Leur densité sur la période d'étude est en moyenne de $9,8.10^3$ cellules/l.

Les chlorophycées représentent entre 2,4 (mai) et 18,4% (novembre) de la biomasse microbienne totale, pour une valeur moyenne de 5,8%. Les biomasses maximales sont atteintes lors du bloom phytoplanctonique en septembre et novembre (69,5 et 229,7 $\mu\text{g C/l}$ respectivement), alors que les biomasses minimales sont observées en juin (2,1 $\mu\text{g C/l}$), date à laquelle la biomasse microbienne totale est la plus faible. Ce groupe phytoplanctonique, dont les espèces majoritaires sont *Sphaerocystis schroeteri* et *Cosmarium novae*, présente une biomasse et une densité moyennes de 40,7 $\mu\text{g C/l}$ et de 686.10^3 cellules/l respectivement.

La contribution des dinophycées à la biomasse microbienne totale est faible ; elle est en moyenne de 3,7% sur la période d'étude (soit 6,7 $\mu\text{g C/l}$ et $0,5.10^3$ cellules/l) et représente entre 0,4 (septembre) et 13% (juin) de la biomasse microbienne totale. Ce groupe est essentiellement représenté par plusieurs espèces du genre *Peridinium*.

Les cyanobactéries sont très peu abondantes dans le lac ; elles représentent en moyenne 3,4% de la biomasse microbienne totale, et le développement des deux principaux genres, *Anabaena* et *Microcystis*, n'est réellement significatif que de juin à juillet (respectivement 7,6 et 9,4% de la biomasse microbienne totale).

b. Picoplancton eucaryote autotrophe

Les picoeucaryotes autotrophes (Fig. IV 1) représentent entre 7,8 (décembre) et 46,2% (mai) de la biomasse microbienne totale ; leur biomasse est comprise entre 10 (décembre) et 380 $\mu\text{g C/l}$ (novembre), avec une valeur moyenne de 100 $\mu\text{g C/l}$ sur la période étudiée.

Leur densité moyenne est de $7,1.10^4$ cellules/ml ; elle varie entre 1,6 (décembre) et $19,1.10^4$ cellules/ml (septembre).

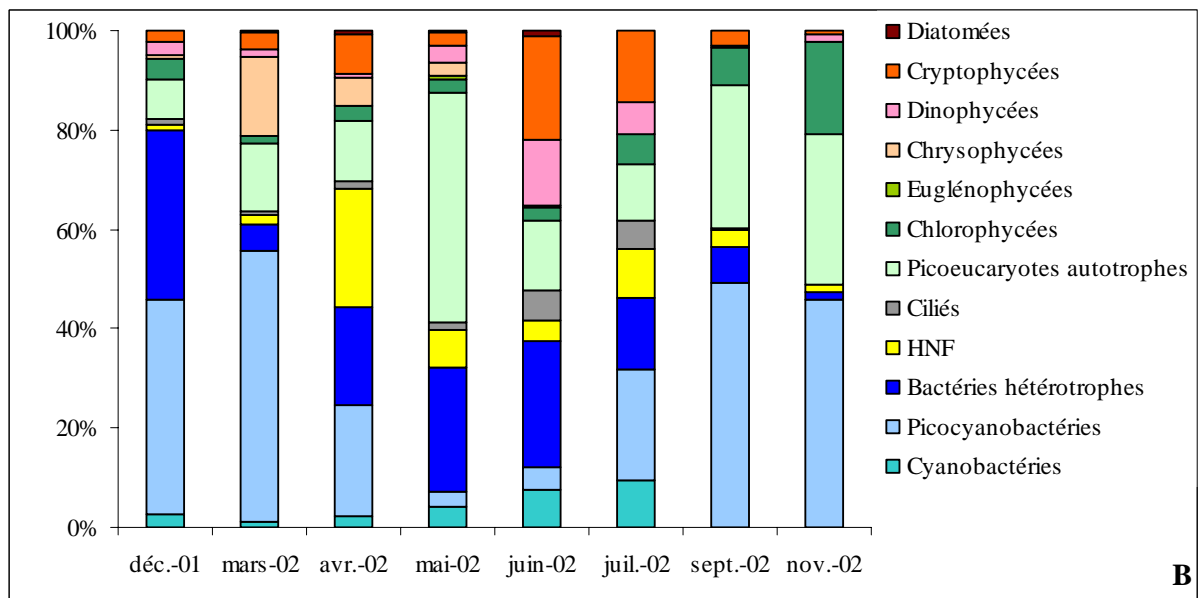
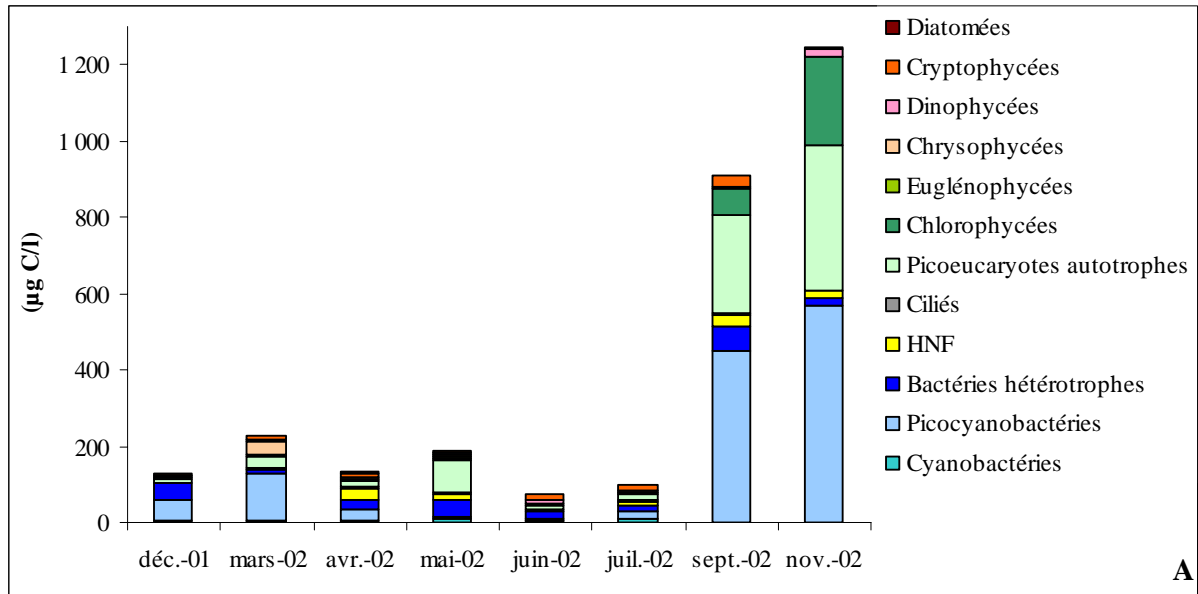


Figure IV 1 : A : Variations saisonnières des composantes de la biomasse microbienne totale [0,7-100] (µg C/l).
B : Contribution relative des différentes composantes de la biomasse microbienne totale [0,7-100] (en pourcentage de la biomasse microbienne totale).

c. Picocyanobactéries

Les picocyanobactéries constituent la majorité de la biomasse microbienne totale (moyenne = 30,6%), avec des biomasses comprises entre 3,4 (juin) et 568,2 $\mu\text{g C/l}$ (novembre), et une moyenne de 157 $\mu\text{g C/l}$ (Fig. IV 1). Cette importante variabilité est associée à une forte variabilité de la densité. Celle-ci est comprise entre 0,3 (juin) et $19,1 \cdot 10^5$ cellules/ml (septembre).

d. Bactéries hétérotrophes

La densité des bactéries hétérotrophes varie de 5,4 (juillet) à $21,7 \cdot 10^5$ cellules/ml (mai) pour une valeur moyenne de $11,9 \cdot 10^5$ cellules/ml. Elles représentent entre 1,6 (novembre) et 34% (décembre) de la biomasse microbienne totale (Fig. IV 1), leur biomasse étant comprise entre 12 (mars) et 65 $\mu\text{g C/l}$ (septembre), pour une moyenne de 30,9 $\mu\text{g C/l}$ sur la période d'étude.

e. Ciliés

L'abondance des ciliés est faible (moyenne = 0,75 cellules/ml), variant entre 0,1 (avril) et 2,1 cellules/ml (juillet). En terme de biomasse, les ciliés représentent en moyenne 2,2% de la biomasse microbienne totale (Fig. IV 1), soit 3 $\mu\text{g C/l}$. Leur biomasse est comprise entre 1,5 (mars) et 5,8 $\mu\text{g C/l}$ (juillet). Les genres les plus représentés sont *Prorodon* et *Strombidium* ainsi que plusieurs espèces de Gymnostomes.

f. Nanoflagellés hétérotrophes (HNF)

Ils représentent en moyenne 6,6% de la biomasse microbienne totale (Fig. IV 1). Leur biomasse est comprise entre 1,1 (décembre) et 31,4 $\mu\text{g C/l}$ (avril). Leur abondance varie de

0,5 (décembre) à 26.10^2 cellules/ml (avril), pour une moyenne de $8,9.10^2$ cellules/ml. La majorité des HNF sont des cellules de type *Katablepharis* ou des chrysomonadines.

2. Dynamique des communautés microbiennes

Au cours de notre étude, la MOP totale [0,7-100] montre des biomasses maximales en septembre et novembre (908 et 1247 $\mu\text{g C/l}$ respectivement) (Fig. IV 1). De décembre à juillet a lieu une longue phase d'eaux claires, période à laquelle la biomasse reste relativement faible, elle est comprise entre 73 (juin) et 227 $\mu\text{g C/l}$ (mars) (Tab. IV 1).

Ces fortes variations temporelles sont principalement liées à la biomasse du picoplancton (bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries et picoeucaryotes autotrophes) qui est en moyenne de 288,6 $\mu\text{g C/l}$, soit 68% de la biomasse microbienne totale. Ainsi, la biomasse des picocyanobactéries est élevée en décembre et en mars (55,3 et 123,6 $\mu\text{g C/l}$ respectivement), puis elle chute progressivement d'avril à juin (3,4 $\mu\text{g C/l}$) pour augmenter à partir de juillet et atteindre une biomasse maximale en novembre (568,2 $\mu\text{g C/l}$). La biomasse des bactéries hétérotrophes montre également de grandes variations au cours de la période d'étude : elle est minimale en mars (12,0 $\mu\text{g C/l}$), augmente jusqu'en mai (47,2 $\mu\text{g C/l}$), diminue fortement en juin et juillet, pour atteindre ses valeurs maximales en automne. Les picoeucaryotes autotrophes montrent, comme les bactéries hétérotrophes, des biomasses élevées mais très variables au printemps, qui chutent en juin (10,2 $\mu\text{g C/l}$) et en juillet (11,2 $\mu\text{g C/l}$), puis s'accroissent en septembre (261,0 $\mu\text{g C/l}$) et en novembre (379,8 $\mu\text{g C/l}$).

Les biomasses maximales de HNF sont atteintes en avril (31,4 $\mu\text{g C/l}$) et en mai (14,6 $\mu\text{g C/l}$), puis celles-ci chutent en juin (3,3 $\mu\text{g C/l}$) et augmentent progressivement à partir du mois de juillet. La biomasse des ciliés est très faible jusqu'en mars, s'accroît faiblement d'avril (2,3 $\mu\text{g C/l}$) à juillet (5,8 $\mu\text{g C/l}$), puis se stabilise à environ 2,7 $\mu\text{g C/l}$ en automne.

L'évolution de la biomasse des cryptophycées est très variable. Elle augmente au dégel printanier du lac, chute en mai (4,9 $\mu\text{g C/l}$), puis s'accroît fortement de juin (15,4 $\mu\text{g C/l}$) à septembre (26,6 $\mu\text{g C/l}$). La biomasse des dinophycées est faible (environ 3,2 $\mu\text{g C/l}$) de décembre à avril, puis s'accroît à des valeurs comprises entre 6,2 et 9,6 $\mu\text{g C/l}$ jusqu'en juillet, et devient maximale en novembre (20,2 $\mu\text{g C/l}$). Les chlorophycées sont présentes dans le lac à des biomasses relativement stables et assez faibles jusqu'au mois de juillet (entre 2,1 et 5,8 $\mu\text{g C/l}$) ; un bloom très marqué apparaît en automne (69,5 et 229,7 $\mu\text{g C/l}$ en septembre et novembre respectivement) dû au développement important de l'algue coloniale *Sphaerocystis schroeteri*. Les cyanobactéries montrent des biomasses stables de décembre à avril, puis celles-ci s'accroissent de mai à juillet (entre 5,6 et 9,3 $\mu\text{g C/l}$), sont pratiquement nulles en septembre, puis augmentent faiblement en novembre (1,9 $\mu\text{g C/l}$). Les autres classes d'algues présentes dans le lac montrent des biomasses très faibles, en particulier les diatomées dont le maximum de biomasse (avril) est de 2,2 $\mu\text{g C/l}$, et dont la contribution la plus forte à la biomasse microbienne totale est observée en juin (1,1%).

3. Conclusion

La MOP de ce lac est donc largement dominée par les organismes picoplanctoniques, et en particulier par les formes autotrophes. Les microalgues phytoplanctoniques, généralement faiblement représentées tout au long de l'étude, correspondent essentiellement aux cryptophycées et aux chlorophycées. En ce qui concerne les protozoaires, les ciliés sont présents à des abondances et des biomasses peu importantes, alors que les HNF peuvent constituer ponctuellement une part non négligeable de la MOP.

La structure et la biomasse des communautés microbiennes rencontrées lors de cette étude sont typiques des lacs de montagne oligotrophes (Reche et al., 1997 ; Callieri et al., 1999 ; Hinder et al., 1999 ; Medina-Sánchez et al., 1999 ; Wille et al., 1999 ; Hobbie et al., 2000).

Dans de tels écosystèmes, les faibles concentrations en nutriments limitent le développement phytoplanctonique, et les bactéries constituent alors une proportion importante de la biomasse microbienne totale (Straškrabová & Šimek, 1993).

De la même manière, dans les lacs oligotrophes, le picoplancton autotrophe peut représenter entre 40 et 60% de la biomasse phytoplanctonique totale (Stockner, 1991) ; en effet, ces cellules picoplanctoniques sont caractérisées par un rapport surface / volume supérieur à celui des cellules de plus grande taille, ce qui constitue un avantage pour la diffusion des nutriments (Chisholm, 1992 ; Stockner et al., 1999). Toutefois, la plupart des études menées dans des lacs de montagne oligotrophes mettent en évidence l'existence de faibles biomasses de picocyanobactéries et / ou de picoplancton eucaryote autotrophe (Callieri et al., 1999 ; Wille et al., 1999). D'après ces auteurs, il semble en effet que les importantes irradiances lumineuses généralement rencontrées dans ces écosystèmes entraîneraient une photoinhibition des cellules picoplanctoniques autotrophes (Bertoni & Callieri, 1999). Par contre, les lacs de montagne aux eaux relativement peu transparentes (par exemple du fait de la présence de MES en quantités importantes) peuvent présenter d'importantes biomasses de picoplancton autotrophe (Hinder et al., 1999). Il faut également noter que nous avons relevé, lors des dénombrements de microorganismes, la présence d'importantes quantités de particules en suspension ; celles-ci pourraient diminuer la transparence des eaux du lac de La Godivelle-d'en-Haut. Celle-ci, ainsi que le niveau trophique du lac, pourraient ainsi expliquer la forte contribution du picoplancton autotrophe à la biomasse microbienne totale.

II. Relations biomarqueurs – biomasse microbienne

1. Biomasse et composition taxonomique des différentes classes de taille

a. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [30-100]

La classe de taille [30-100] constitue entre 4,6 (novembre) et 36,9% (avril) de la biomasse microbienne totale [0,7-100] (Fig. IV 2, Tab. IV 1, 2), soit en moyenne 19,8% de celle-ci. Les valeurs de biomasse de cette classe de taille sont comprises entre 9,6 (décembre) et 56,9 $\mu\text{g C/l}$ (novembre) pour une valeur moyenne de 39,2 $\mu\text{g C/l}$.

Cette classe de taille (Fig. IV 3) est principalement constituée, en terme de biomasse, de HNF (6,3 à 50,8% du peuplement), de chlorophycées (0,1 à 68,8%), de cryptophycées (2 à 74,1%) et de chrysophycées (0 à 69,3%), les autres taxons étant présents à des biomasses très faibles (<2 $\mu\text{g C/l}$ en moyenne).

Pour chaque date d'échantillonnage, la classe de taille [30-100] est généralement largement dominée par un ou deux taxons qui constituent plus de 60% de la biomasse. Ainsi, la biomasse de la classe de taille [30-100] est dominée par les chrysophycées en mars (69,3% de la biomasse), les HNF en avril (64,4%), les cryptophycées en juin (74,1%), les HNF et les cryptophycées en juillet (respectivement 30,0 et 39,1% de la biomasse), les HNF et les chlorophycées en septembre (respectivement 50,8 et 41,0%), les chlorophycées en novembre (68,8% de la biomasse).

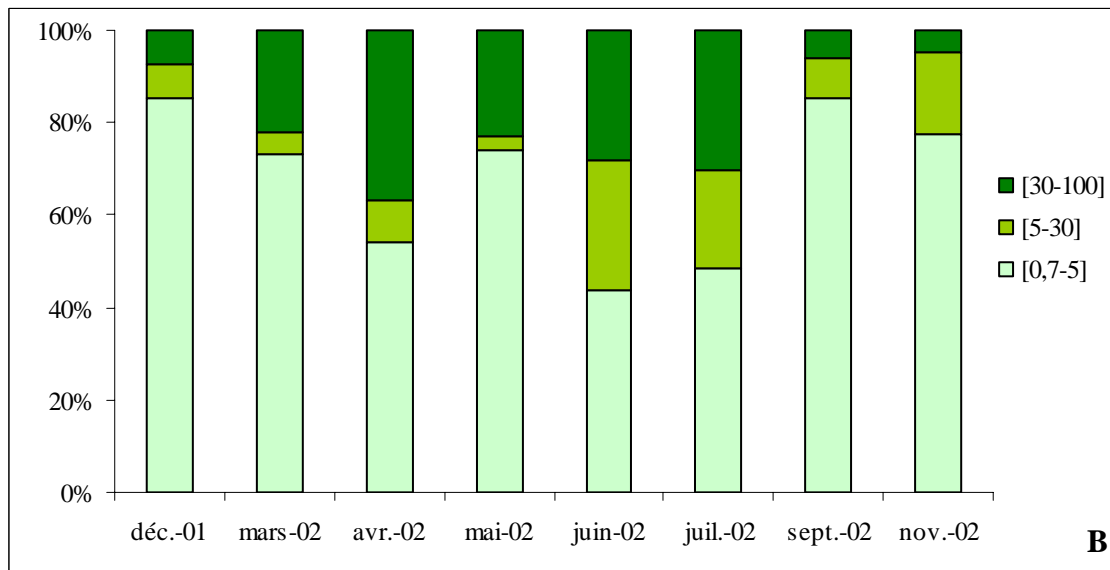
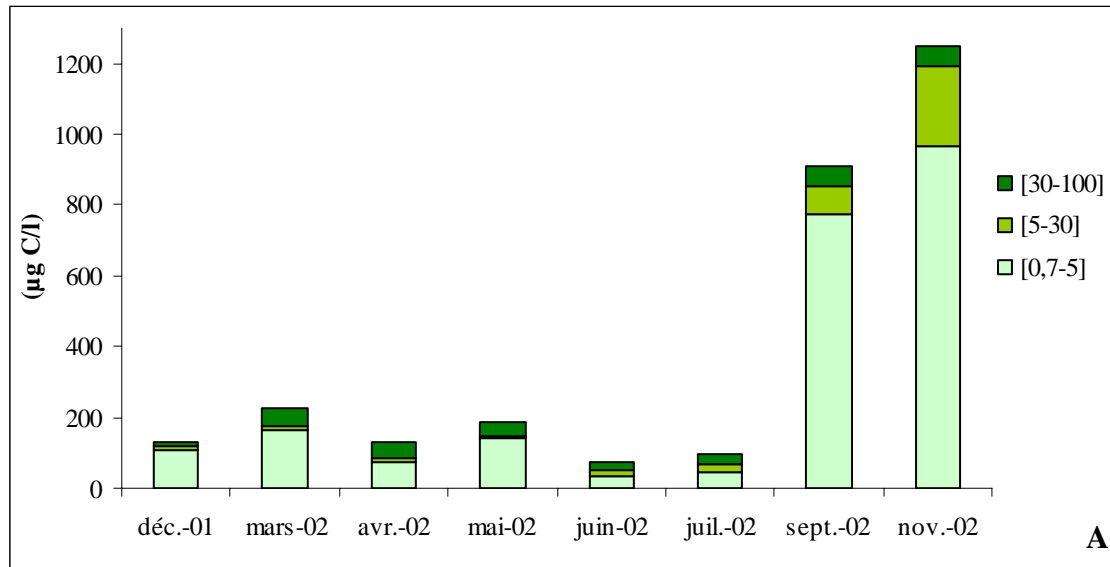


Figure IV 2 : A : Variations saisonnières des biomasses des différentes classes de taille ($\mu\text{g C/l}$).
B : Contribution des différentes classes de taille à la biomasse microbienne totale [0,7-100] (en pourcentage de la biomasse microbienne totale).

	déc-01	mars-02	avr-02	mai-02	juin-02	juil-02	sept-02	nov-02	Moyenne
[30-100]	9,6	49,9	48,7	43,1	20,8	29,9	54,5	56,9	39,2
[5-30]	9,4	10,9	12,0	5,9	20,5	20,9	78,5	222,0	47,5
[0,7-5]	108,6	166,2	71,4	139,6	32,1	47,7	775,4	968,3	288,6
[0,7-100]	127,6	227,1	132,1	188,6	73,4	98,5	908,3	1247,2	375,3

Tableau IV 1 : Variations saisonnières des biomasses des différentes classes de taille et de la biomasse microbienne totale [0,7-100] et moyennes sur la période d'étude ($\mu\text{g C/l}$).

	déc-01	mars-02	avr-02	mai-02	juin-02	juil-02	sept-02	nov-02	Moyenne
[30-100]	7,6	22,0	36,9	22,9	28,3	30,4	6,0	4,6	19,8
[5-30]	7,4	4,8	9,1	3,2	28,0	21,2	8,6	17,8	12,5
[0,7-5]	85,1	73,2	54,1	74,0	43,7	48,4	85,4	77,6	67,7

Tableau IV 2 : Contribution des différentes classes de taille à la biomasse microbienne totale [0,7-100] et moyennes sur la période d'étude (en pourcentage de la biomasse microbienne totale).

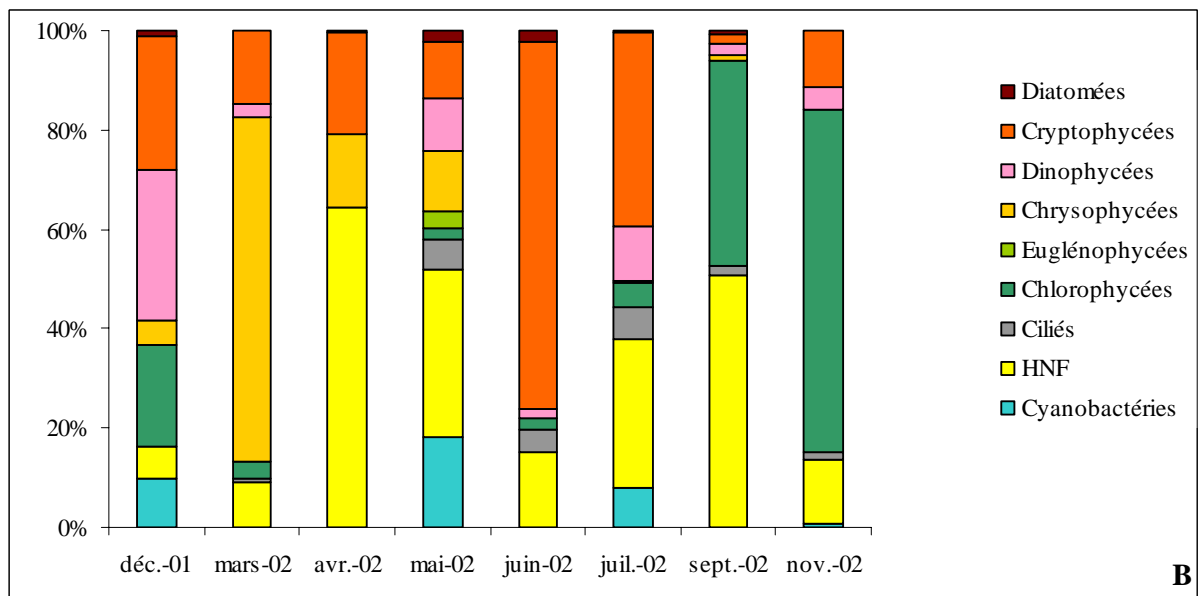
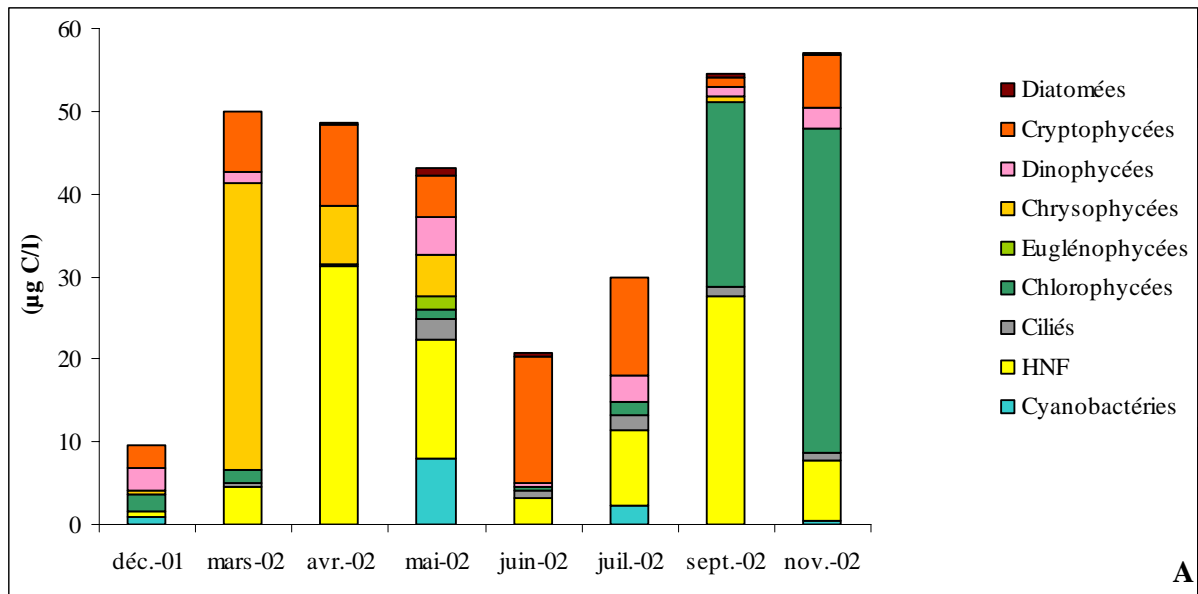


Figure IV 3 : A : Variations saisonnières des composantes de la biomasse microbienne de la classe de taille [30-100] (µg C/l).
B : Contribution des différentes composantes de la biomasse microbienne [30-100] (en pourcentage de la biomasse microbienne de la classe de taille [30-100]).

b. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [5-30]

La biomasse de la fraction [5-30] varie entre 9,4 (décembre) et 222 $\mu\text{g C/l}$ (novembre), avec une moyenne sur la période étudiée de 47,5 $\mu\text{g C/l}$ (Fig. IV 2, Tab. IV 1). Sa contribution à la biomasse microbienne totale (Tab. IV 2) est en moyenne de 12,5%, elle est minimale en mai (3,2%) et maximale en juin (28%).

Le peuplement de la classe de taille [5-30] est principalement constitué de chlorophycées, de dinophycées et de cryptophycées qui représentent l'essentiel de la biomasse [5-30] échantillonnée au cours de la période d'étude (Fig. IV 4). De décembre à juillet, les cyanobactéries et les ciliés constituent également une part non négligeable de la biomasse.

A noter que la biomasse de cette classe de taille est relativement faible jusqu'au mois de juillet inclus ($\leq 20 \mu\text{g C/l}$), puis qu'elle est marquée par un bloom automnal de la chlorophycée *Sphaerocystis schroeteri* correspondant à une biomasse spécifique de 190 $\mu\text{g C/l}$ en novembre.

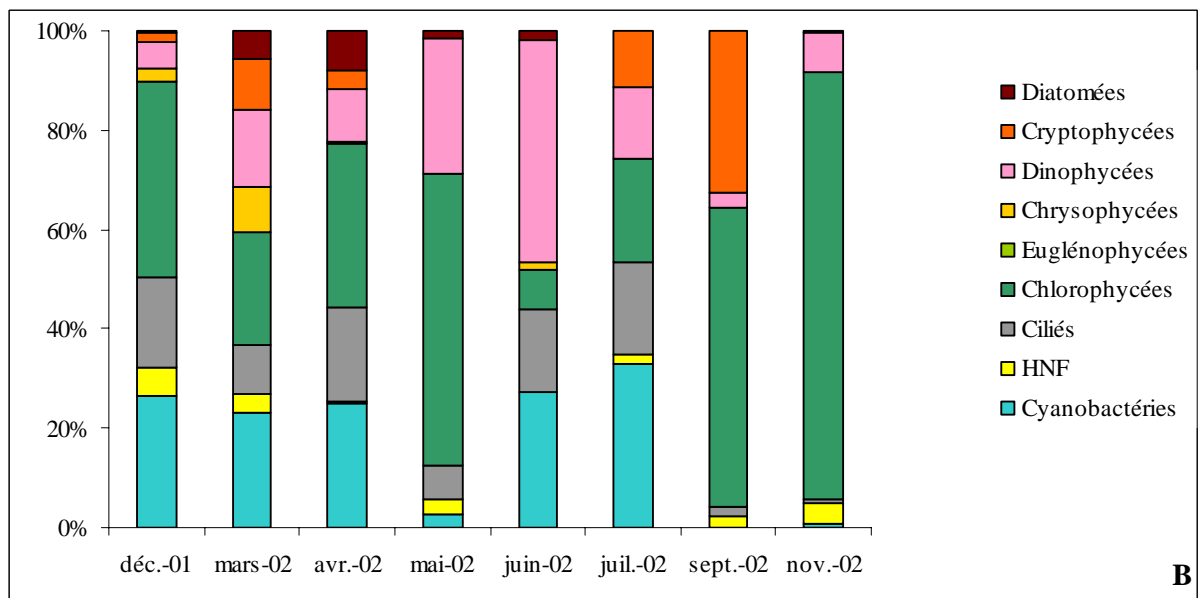
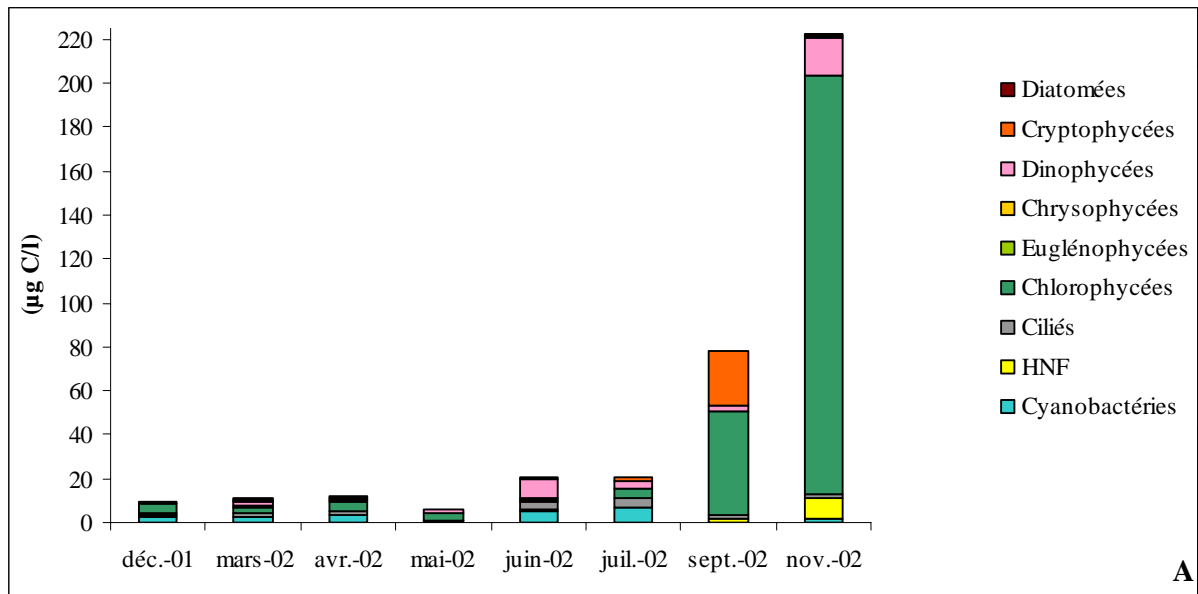


Figure IV 4 : A : Variations saisonnières des composantes de la biomasse microbienne de la classe de taille [5-30] ($\mu\text{g C/l}$).
B : Contribution des différentes composantes de la biomasse microbienne [5-30] (en pourcentage de la biomasse microbienne de la classe de taille [5-30]).

c. Biomasse et composition taxonomique de la classe de taille [0,7-5]

La classe de taille [0,7-5] est la fraction dominante de la MOP, elle représente en moyenne 67,7% de la biomasse microbienne totale (Fig. IV 2, Tab. IV 1, 2) ; sa contribution à la MOP totale oscille entre 43,7 (juin) et 85,4% (septembre). Sa biomasse est comprise entre 32 (juin) et 968 $\mu\text{g C/l}$ (novembre), avec une valeur moyenne de 289 $\mu\text{g C/l}$.

Cette fraction picoplanctonique (Fig. IV 5) est dominée en terme de biomasse par les picocyanobactéries (43% en moyenne), le picoplancton eucaryote autotrophe (30% en moyenne) et les bactéries hétérotrophes (27% en moyenne) qui correspondent respectivement à des biomasses moyennes de 157, 100 et 30,9 $\mu\text{g C/l}$ sur la période d'étude. Les picoeucaryotes et les bactéries hétérotrophes dominent ensemble la classe de taille [0,7-5] d'avril à juin, alors que les picocyanobactéries constituent plus de 45% de la fraction picoplanctonique aux autres dates d'échantillonnage.

Les autres taxa rencontrés au sein de cette classe de taille (HNF, ciliés, kystes de chrysophycées et de dinophycées, cryptophycées) constituent des biomasses faibles ($<0,002 \mu\text{g C/l}$).

d. Conclusion

Le fractionnement en classes de taille de la MOP [0,7-100] souligne la contribution dominante de la fraction [0,7-5], et par conséquent des cellules picoplanctoniques (picocyanobactéries, bactéries hétérotrophes et picoplancton eucaryote autotrophe) à la biomasse microbienne totale. Ce type de distribution est caractéristique des milieux oligotrophes car, dans de tels écosystèmes, le picoplancton est plus compétitif par rapport aux nutriments que les algues de grande taille (Stockner, 1991).

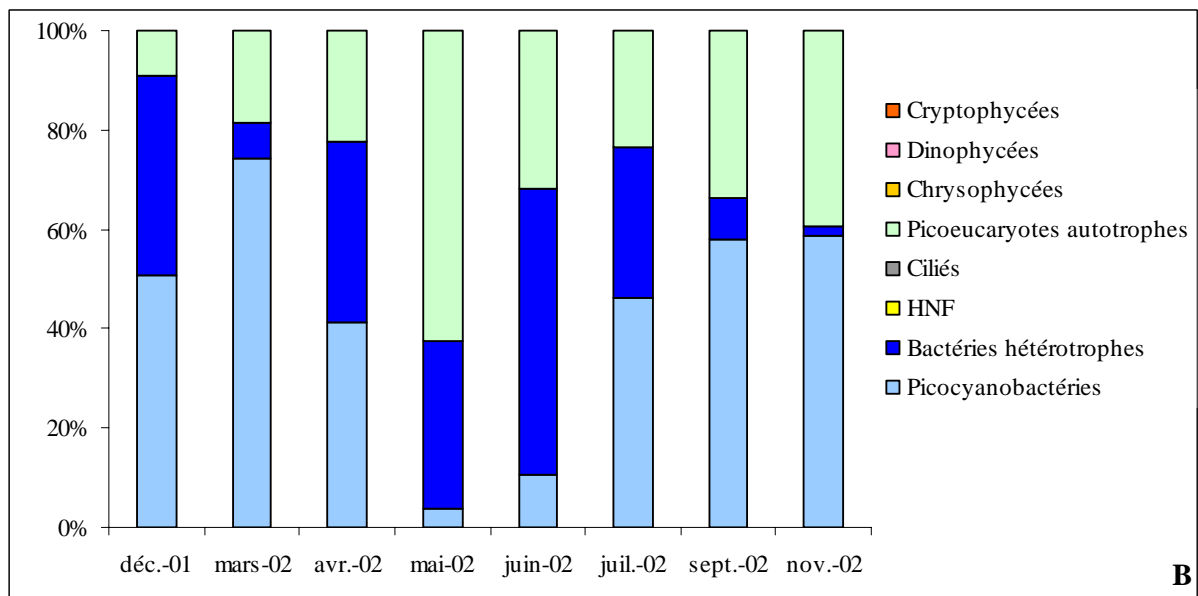
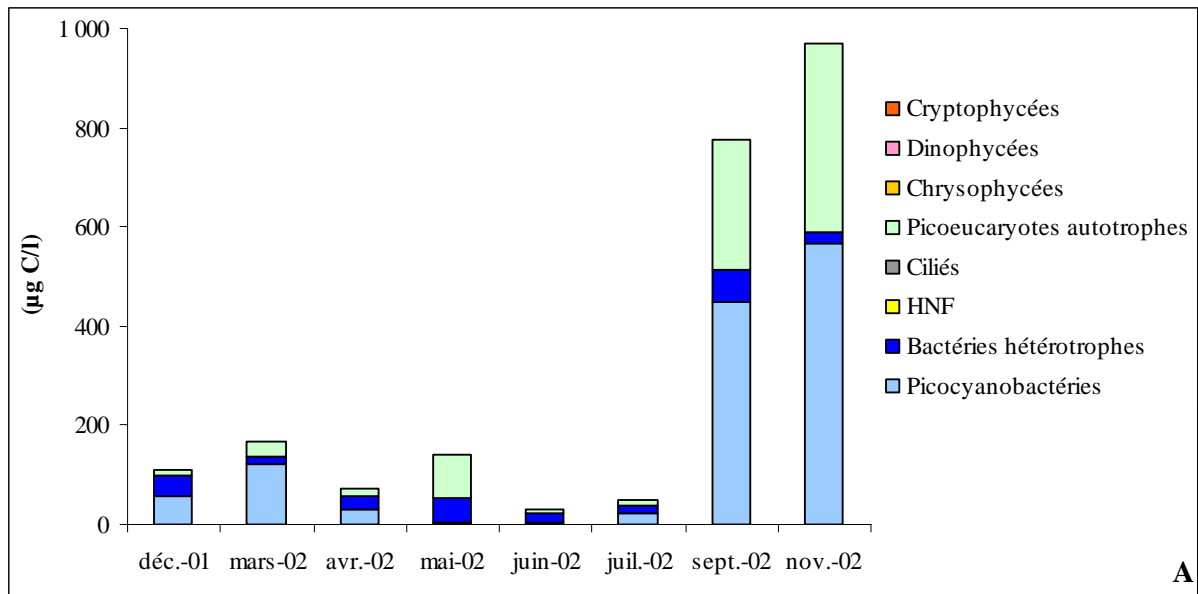


Figure IV 5 : A : Variations saisonnières des composantes de la biomasse microbienne de la classe de taille [0,7-5] ($\mu\text{g C/l}$).
B : Contribution des différentes composantes de la biomasse microbienne [0,7-5] (en pourcentage de la biomasse microbienne de la classe de taille [0,7-5]).

Un certain nombre de biais méthodologiques ont été attribués au fractionnement de la MOP en classes de taille. Ainsi, Carrias et al. (2001) et Bec (2003) ont observé lors de filtrations successives que certaines particules de taille supérieure au vide de maille du filtre pouvaient être présentes dans le filtrat. Le passage ou la rétention aléatoires de certaines particules à travers les différents filtres pourraient alors expliquer pourquoi les fractions [5-30] et [30-100] sont finalement assez proches du point de vue des taxa présents. Toutefois, le fractionnement en classes de tailles s'avère utile et nous permet de différencier ces deux classes par la dominance en terme de biomasse de certains groupes taxonomiques, particulièrement lors d'une comparaison date à date. Par contre, la classe de taille [0,7-5] présente une composition taxonomique originale dominée par les cellules picoplanctoniques, puisque la majorité des cellules de taille supérieure à 5µm ont été écartées lors de la filtration différentielle.

2. Composition en acides gras des différentes classes de taille

Les compositions en AG des trois classes de taille (Tab. IV 3, 4, 5) présentent toutes de fortes proportions en AGS, dominés par le 16:0. Les AGPI peuvent constituer une proportion importante des AG totaux (AGT). Ils représentent ainsi entre 29,2 et 37,8% des AGT dans la classe de taille [30-100], entre 17,4 et 38,2% des AGT dans la fraction [5-30], et entre 14,1 et 29,8% des AGT dans la classe de taille [0,7-5]. Ils sont principalement représentés par les AGPI de la série (n-3). Les AGPI de la série (n-6) peuvent également constituer, pour certains prélèvements, une part importante des AGT dans certains échantillons. Les AGMI sont généralement plus minoritaires, les principaux étant le 16:1(n-7), le 18:1(n-9), ainsi que le 18:1(n-7) dans la classe de taille [0,7-5]. Cette fraction picoplanctonique montre également des pourcentages importants d'AGR (Fig. IV 6) en comparaison des deux autres classes de taille. Ces AG étant présents en quantités élevées dans

les bactéries hétérotrophes (White et al., 1980 ; Tronczynski et al., 1985), il est logique de les rencontrer préférentiellement dans la classe de taille [0,7-5]. De plus, la proportion très élevée en AGR observée dans cette classe de taille en septembre est associée à la plus forte biomasse de bactéries hétérotrophes notée au cours de notre étude (Fig. IV 5). Les teneurs en AGR dans les fractions [5-30] et [30-100] sont faibles (<5% du poids des AGT) et assez constantes tout au long de la période d'étude, sauf en automne dans la fraction [5-30] où l'on observe une augmentation de ces proportions probablement liée à l'importante biomasse de flagellés hétérotrophes (Fig. IV 4) qui pourraient jouer ici le rôle d'accumulateurs de ces AG (Bec, 2003).

L'évolution temporelle des proportions en AGPI (n-3) dans les trois classes de taille montre une distribution inverse aux AGR (Fig. IV 7), à savoir des teneurs élevées dans la fraction [30-100], faibles dans la fraction [0,7-5], et moyennes dans la fraction [5-30]. Les algues phytoplanctoniques, présentes majoritairement dans les classes de taille [5-30] et [30-100] (Fig. IV 3, 4), sont riches en AGPI (n-3) (Sargent & Whittle, 1981 ; Frederickson et al., 1986 ; Bourdier & Amblard, 1987 ; Ahlgren et al., 1992), ce qui explique des teneurs plus élevées en ces composés observées dans ces deux classes de taille.

Ces observations sont confirmées par une analyse en composantes principales réalisée à partir des compositions en AG des différentes classes de taille de la MOP (Fig. IV 8). L'axe I, qui explique 31% de la variabilité, distingue d'une part la classe de taille [30-100] riche en AGPI (n-3), et d'autre part la classe de taille [0,7-5] riche en AGR, en 18:1(n-7) et en 16:1(n-7). La fraction [5-30] occupe une position intermédiaire entre les deux autres classes de taille.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
12:0	1,68	1,58 ± 0,57	1,65	*	0,93 ± 0,41	Tr	0,84 ± 0,08	1,49 ± 0,57
13:0	-	-	-		-	-	-	0,74 ± 0,21
14:0	9,83	8,37 ± 1,95	8,66		9,77 ± 1,15	4,84 ± 4,60	5,20 ± 0,99	6,25 ± 0,81
15:0	2,08	1,70 ± 0,13	1,81		1,82 ± 0,26	2,26 ± 1,09	4,48 ± 1,13	4,64 ± 0,40
16:0	19,68	22,46 ± 0,80	21,88		22,34 ± 1,73	17,30 ± 8,60	20,03 ± 1,48	24,06 ± 0,56
17:0	1,12	1,01 ± 0,56	1,10		1,23 ± 0,28	2,38 ± 1,59	1,12 ± 0,04	1,36 ± 0,14
18:0	3,56	6,57 ± 3,30	4,51		4,33 ± 0,49	4,96 ± 0,13	4,29 ± 1,53	5,07 ± 1,62
20:0	-	0,45 ± 0,64	0,68		Tr	Tr	-	-
22:0	-	0,75 ± 1,06	Tr		-	6,90 ± 9,76	-	Tr
24:0	-	0,94 ± 1,34	Tr		Tr	5,93 ± 7,77	-	0,70 ± 0,74
AGR	2,78	2,69 ± 0,49	2,67		1,40 ± 0,80	1,18 ± 1,68	2,18 ± 0,80	2,36 ± 1,02
16:1(n-9)	3,71	3,19 ± 0,65	2,02		3,90 ± 0,32	1,61 ± 2,28	3,14 ± 0,83	4,26 ± 0,84
16:1(n-7)	2,12	1,91 ± 0,01	5,68		1,67 ± 0,13	1,12 ± 1,58	1,70 ± 0,33	1,63 ± 0,78
17:1(n-9)	-	-	-		-	-	4,02 ± 1,12	3,17 ± 0,19
18:1(n-9)	13,87	16,23 ± 0,13	9,63		13,69 ± 0,75	7,84 ± 6,14	12,46 ± 0,56	10,63 ± 0,50
18:1(n-7)	-	0,96 ± 0,09	1,14		0,67 ± 0,04	0,71 ± 1,00	1,27 ± 0,10	0,98 ± 0,11
20:1(n-9)	-	-	-		-	-	-	0,73 ± 0,13
16 PI	3,57	2,01 ± 1,50	4,33		2,65 ± 0,79	6,08 ± 7,81	1,74 ± 0,21	4,08 ± 0,64
18:2(n-6)	5,80	5,98 ± 0,62	7,06		8,30 ± 0,70	4,93 ± 0,61	13,32 ± 3,84	7,33 ± 0,74
18:3(n-6)	-	-	-		0,23 ± 0,20	-	0,66 ± 0,00	-
18:3(n-3)	4,92	2,82 ± 0,13	6,09		4,06 ± 0,65	5,19 ± 0,14	9,44 ± 2,94	8,48 ± 0,90
18:4(n-3)	5,63	3,73 ± 0,43	4,46		4,69 ± 0,34	3,18 ± 4,50	6,11 ± 0,84	3,44 ± 0,39
20:2(n-6)	3,41	2,88 ± 0,00	3,63		3,78 ± 0,16	4,80 ± 1,14	1,17 ± 0,08	0,69 ± 0,65
20:4(n-6)	-	-	-		-	1,77 ± 2,51	-	-
20:3(n-3)	0,76	0,72 ± 0,10	0,98		0,80 ± 0,17	2,54 ± 2,33	Tr	0,54 ± 0,36
20:4(n-3)	-	-	-		Tr	-	Tr	-
20:5(n-3)	3,52	2,87 ± 0,35	3,74		3,26 ± 0,04	3,53 ± 1,76	1,71 ± 0,09	1,72 ± 0,25
22:3(n-6)	-	-	-		0,59 ± 1,02	-	-	-
22:3(n-3)	1,56	0,64 ± 0,91	0,79		Tr	0,62 ± 0,88	0,83 ± 0,03	0,88 ± 0,79
22:6(n-3)	6,33	8,21 ± 2,58	4,34		6,87 ± 1,16	4,57 ± 3,48	2,87 ± 0,86	1,97 ± 0,34
NI	4,05	1,32 ± 0,69	1,22		1,70 ± 0,94	5,21 ± 6,60	0,88 ± 0,31	2,58 ± 1,87
AGS	40,73	46,53	42,96		41,82	45,75	38,14	46,66
AGMI	19,70	22,29	18,47		19,93	11,28	22,59	21,40
AGPI	35,51	29,87	35,41		35,23	37,21	37,83	29,15
(n-3)	22,73	18,99	20,40		19,68	19,63	20,95	17,05
(n-6)	9,21	8,86	10,69		12,90	11,50	15,14	8,02
(n-3)/(n-6)	2,47	2,14	1,91		1,53	1,71	1,38	2,13
AGT	0,10	0,06 ± 0,04	0,04		0,18 ± 0,09	0,05 ± 0,03	0,19 ± 0,06	0,17 ± 0,02

Tableau IV 3 : Poids des acides gras totaux (en µg/l) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [30-100] (moyennes ± écart-types).

* : données manquantes ; AGT : acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés (iso 15:0, ante 15:0, ante 17:0, ante 17:0) ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces ($\leq 0,5\%$).

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
12:0	2,10	3,51	1,62	*	-	-	Tr	1,17 ± 0,44
14:0	8,57	6,37	6,83		5,65	4,44	3,33 ± 0,76	4,87 ± 0,83
15:0	3,59	3,20	1,56		2,22	2,99	2,34 ± 0,31	2,07 ± 0,67
16:0	27,81	26,32	22,92		23,51	21,34	21,66 ± 0,86	21,73 ± 0,94
17:0	1,54	1,69	1,50			2,01	2,07 ± 0,14	1,50 ± 0,41
18:0	9,29	12,42	4,65		10,51	5,68	6,68 ± 2,06	5,28 ± 1,03
20:0	0,88	-	-		-	-	-	-
24:0	-	-	-		5,06	3,39	0,95 ± 1,11	Tr
AGR					2,14	2,70	9,97 ± 2,09	10,94 ± 2,50
16:1(n-11)	-	-	-		-	-	1,32 ± 1,20	-
16:1(n-9)	4,98	2,25	2,32		3,03	1,64	2,35 ± 0,40	2,12 ± 0,47
16:1(n-7)	1,10	2,24	9,71		2,64	9,14	8,92 ± 1,13	11,58 ± 0,99
17:1(n-9)	-	-	-		3,11	-	1,13 ± 1,05	-
17:1(n-7)	-	-	-		-	-	1,37 ± 1,19	-
18:1(n-9)	7,39	10,15	9,05		9,16	6,54	6,28 ± 0,18	5,56 ± 0,72
18:1(n-7)	-	1,75	1,61		1,67	3,79	6,52 ± 0,36	8,24 ± 1,02
20:1(n-9)	2,12	-	-		-	-	-	-
16 PI	7,43	5,73	3,52				2,46 ± 0,93	2,11 ± 0,87
18:2(n-6)	4,13	5,79	5,61		9,12	4,54	4,81 ± 0,40	4,12 ± 0,77
18:3(n-3)	2,27	3,08	4,37		4,24	5,65	5,75 ± 0,36	5,14 ± 0,75
18:4(n-3)	-	2,44	4,42		3,58	4,28	1,98 ± 0,07	2,27 ± 0,22
20:2(n-6)	-	1,95	4,77		3,70	-	-	-
20:3(n-3)	-	-	1,33		1,50	2,17	Tr	Tr
20:5(n-3)	1,32	2,44	4,45		1,94	2,83	1,52 ± 0,12	0,77 ± 0,16
22:3(n-6)	-	-	1,07		1,56	3,59	1,43 ± 1,73	1,22 ± 2,11
22:3(n-3)	5,69	5,23	2,03		-	-	1,33 ± 2,30	1,75 ± 1,53
22:6(n-3)	4,03	3,45	6,68		1,96	3,46	1,39 ± 0,72	-
NI	5,77	-	-		3,70	9,81	3,80 ± 2,75	4,49 ± 0,90
AGS	53,77	53,50	39,08		49,09	42,56	46,99	47,55
AGMI	15,58	16,39	22,69		19,61	21,10	27,89	27,49
AGPI	24,87	30,11	38,24		27,59	26,53	20,67	17,38
(n-3)	13,31	16,64	23,27		13,21	18,40	11,97	9,93
(n-6)	4,13	7,74	11,44		14,38	8,13	6,25	5,34
(n-3) / (n-6)	3,22	2,15	2,03		0,92	2,26	1,92	1,86
AGT	0,04	0,01	0,02		0,05	0,01	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,00

Tableau IV 4 : Poids des acides gras totaux (en µg/l) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [5-30] (moyennes ± écart-types).

* : données manquantes ; AGT : acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés (iso 15:0, ante 15:0, iso 17:0, ante 17:0) ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces (≤0,5%).

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
12:0	3,05	1,86	4,05	1,39	0,78	0,81	1,18	2,41
13:0	-	0,31	-	0,54	-	-	Tr	2,48
14:0	5,31	4,79	5,68	6,50	4,66	5,27	4,24	4,00
15:0	1,70	1,46	1,97	1,48	2,03	2,30	1,31	9,58
16:0	30,16	19,63	22,00	21,41	21,41	21,74	17,35	20,00
17:0	1,36	0,91	0,98	Tr	0,98	1,52	1,35	1,28
18:0	14,51	8,78	8,66	4,91	5,65	10,87	2,97	1,53
20:0	1,49	Tr	1,43	Tr	Tr	Tr	Tr	0,91
22:0	0,98	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	-
24:0	-	5,40	8,81	4,90	3,54	5,16	1,01	1,69
AGR	9,02	14,65	6,08	8,14	6,99	10,78	18,76	8,66
15:1	-	-	-	Tr	Tr	0,61	-	-
16:1(n-11)	-	-	-	Tr	0,68	1,52	3,03	-
16:1(n-9)	1,60	2,49	1,62	0,69	1,93	3,33	2,17	5,35
16:1(n-7)	2,43	5,93	4,98	5,86	6,93	5,51	15,15	2,40
17:1(n-7)	-	0,55	-	Tr	1,55	Tr	0,94	-
18:1(n-12)	-	-	1,21	3,76	1,54	-	-	-
18:1(n-9)	8,04	5,59	6,36	7,28	7,18	5,84	3,75	1,24
18:1(n-7)	1,70	4,17	2,40	3,16	6,80	2,95	9,08	0,75
18:1(n-6)	-	-	-	-	-	0,54	0,60	-
20:1(n-9)	1,49	2,22	2,09	5,94	4,29	2,77	1,28	0,87
22:1(n-9)	-	-	-	0,37	-	-	Tr	-
24:1(n-9)	-	Tr	0,90	0,79	0,51	-	Tr	1,94
16 PI	7,98	6,35	5,76	2,08	2,63	3,00	5,31	12,03
18:2(n-6)	4,16	5,57	6,38	4,58	6,06	4,98	3,05	1,50
18:3(n-6)	-	-	-	-	-	-	Tr	0,92
18:3(n-3)	1,73	3,39	3,46	7,76	5,49	3,88	3,28	2,18
20:2(n-6)	-	0,70	1,19	0,34	0,72	-	-	0,84
20:4(n-6)	-	-	-	Tr	-	-	-	0,72
20:3(n-3)	-	Tr	1,43	1,01	0,61	1,36	Tr	2,17
20:5(n-3)	-	0,90	1,15	1,41	1,24	1,14	1,32	3,74
22:3(n-6)	2,03	-	-	-	-	-	-	-
22:3(n-3)	-	Tr	-	Tr	0,75	Tr	-	-
22:6(n-3)	1,25	2,03	0,86	1,65	1,99	1,10	Tr	5,67
NI	-	0,91	0,56	1,03	1,72	1,35	Tr	5,14
AGS	67,58	58,10	59,66	50,33	46,91	59,28	48,54	52,55
AGMI	15,26	21,34	19,56	29,05	31,90	23,53	36,44	12,55
AGPI	17,16	19,65	20,23	19,58	19,48	15,83	14,05	29,77
(n-3)	2,98	7,03	6,89	12,27	10,07	7,85	5,42	13,76
(n-6)	6,19	6,27	7,57	5,23	6,78	4,98	3,31	3,98
(n-3) / (n-6)	0,48	1,12	0,91	2,34	1,48	1,58	1,64	3,45
AGT	0,16	0,16	0,06	0,09	0,08	0,37	0,80	0,69

Tableau IV 5 : Poids des acides gras totaux (en µg/l) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [0,7-5].

AGT : acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés (iso 13:0, iso 14:0, iso 15:0, ante 15:0, iso 17:0, ante 17:0) ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces ($\leq 0,5\%$).



Figure IV 6 : Variations saisonnières de la somme des acides gras ramifiés (iso 13:0, iso 14:0, iso 15:0, ante 15:0, iso 17:0, ante 17:0) (en pourcentage du poids des acides gras totaux) au sein des lipides totaux extraits des différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]).
* : données manquantes.

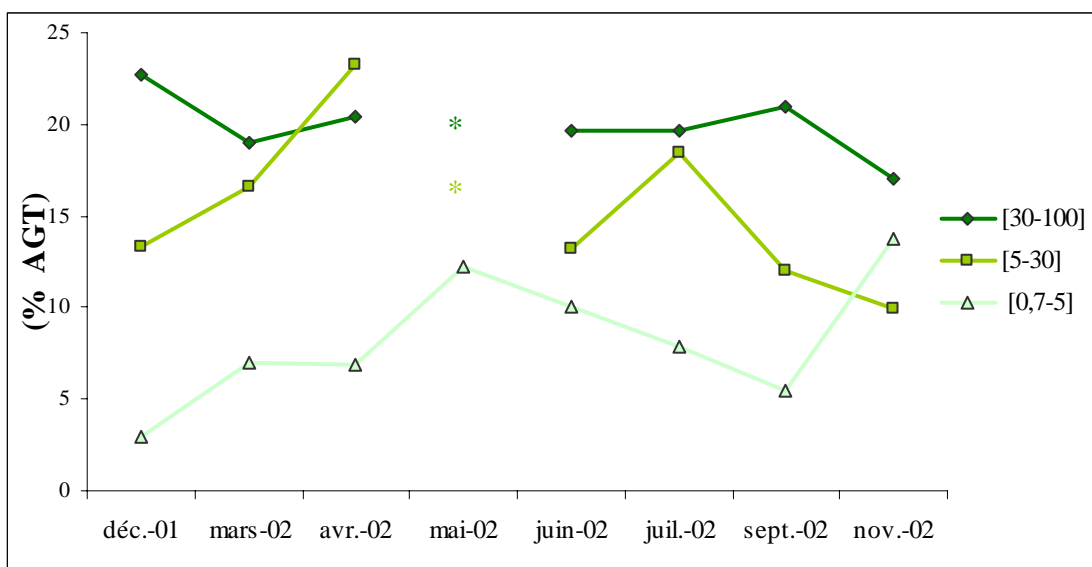


Figure IV 7 : Variations saisonnières de l'ensemble des AGPI (n-3) (en pourcentage du poids des acides gras totaux) au sein des lipides totaux extraits des différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]).
* : données manquantes.

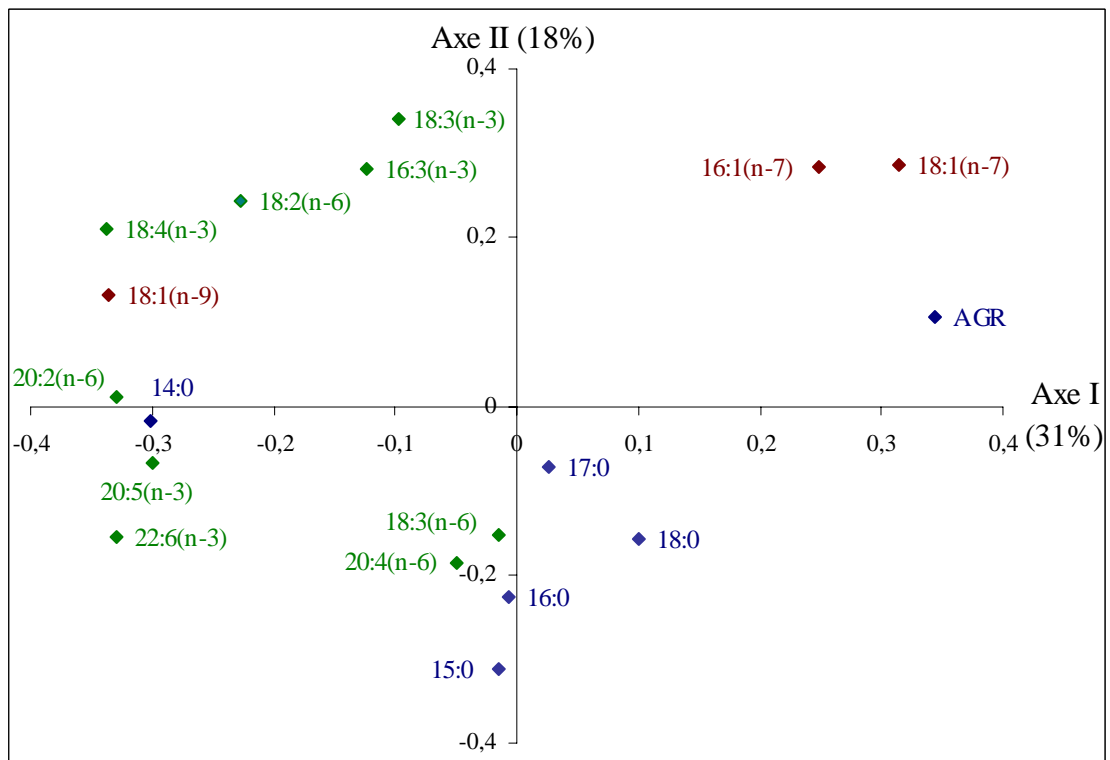
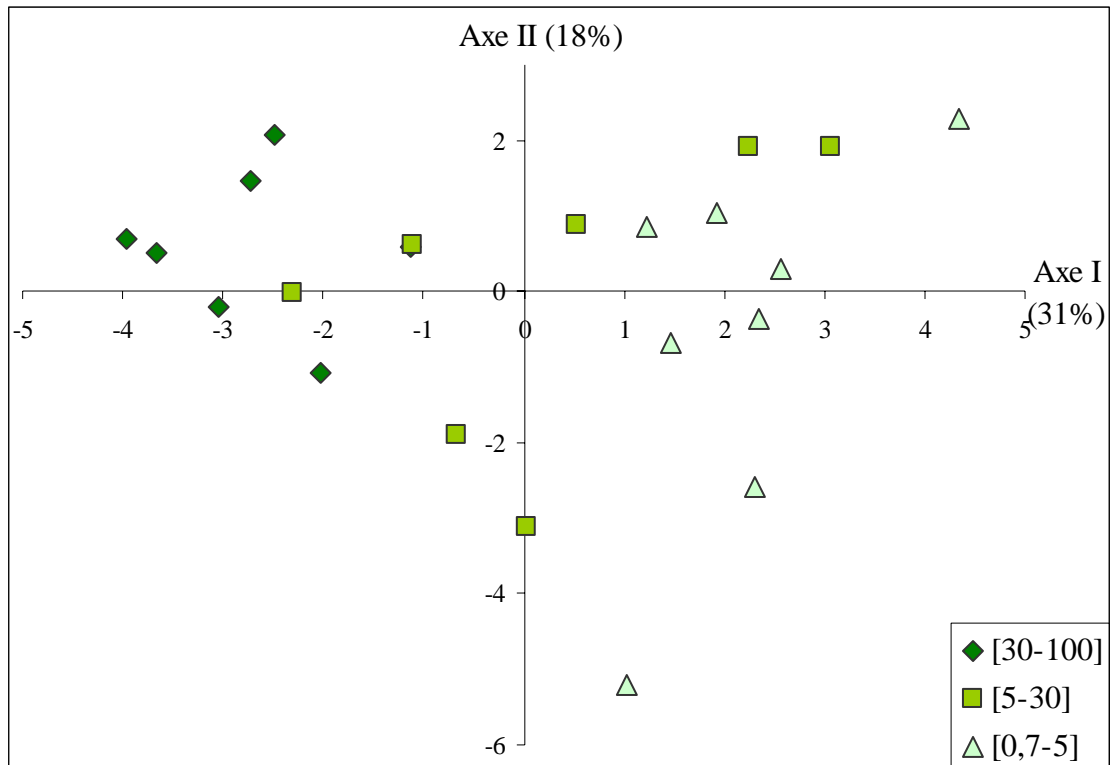


Figure IV 8 : Analyse en composantes principales réalisée à partir des compositions en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux, données non transformées) des lipides totaux extraits des différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]). AGR : acides gras ramifiés.

3. Composition pigmentaire des différentes classes de taille

Lors de l'étude de la composition pigmentaire de la MOP du lac de La Godivelle-d'en-Haut, une vingtaine de pigments ont été identifiés (caroténoïdes, chlorophylles et leurs dérivés). Nous ne nous intéresserons ici qu'aux pigments communément utilisés en tant que marqueurs des différents groupes phytoplanctoniques et qui ont pu être séparés et identifiés au cours de cette étude.

La figure IV 9 représente les variations saisonnières des concentrations en chlorophylle *a* au sein des trois classes de taille obtenues à partir des analyses en HPLC. Celles-ci sont inférieures à 0,08 µg/l de décembre à septembre et s'élèvent en novembre avec des valeurs de 0,44, 0,21 et 0,64 µg/l respectivement dans les classes de taille [30-100], [5-30] et [0,7-5]. La chlorophylle *a* fournit une estimation de la biomasse phytoplanctonique totale. Il faut toutefois noter que les concentrations en chlorophylle *a* obtenues pour chacune des trois classes de taille semblent contradictoires avec les biomasses microbiennes de ces classes de tailles présentées sur la figure IV 2 A et le tableau IV 2. En effet, ces biomasses microbiennes comprennent l'ensemble des organismes auto- et hétérotrophes. La contribution des organismes photosynthétiques à la biomasse microbienne totale étant variable d'une date d'échantillonnage à l'autre, les concentrations en chlorophylle *a* obtenues ne peuvent par conséquent être associées à la biomasse microbienne totale.

Pour chaque classe de taille, nous avons obtenu des corrélations linéaires significatives entre la biomasse phytoplanctonique totale estimée à l'aide des dénombrements cellulaires (organismes photosynthétiques uniquement pris en compte) et la concentration en chlorophylle *a* obtenue lors des analyses pigmentaires réalisées en HPLC ([30-100] : $r=0,92$, $p<0,005$, $n=7$; [5-30] : $r=0,93$, $p<0,005$, $n=7$; [0,7-5] : $r=0,98$, $p<0,005$, $n=7$).

La composition relative en pigments marqueurs de chaque classe de taille est représentée sur la figure IV 10. Les fractions [5-30] et [30-100] montrent une composition

pigmentaire relativement proche et représentée par une diversité de pigments marqueurs. Les principaux pigments de ces deux classes de taille sont la lutéine, la chlorophylle *b* et la péridinine. Dans la classe de taille [0,7-5], la composition pigmentaire, moins diversifiée, est marquée essentiellement par la chlorophylle *b*, la zéaxanthine, et la lutéine qui est le pigment marqueur le plus abondant au sein de cette classe de taille.

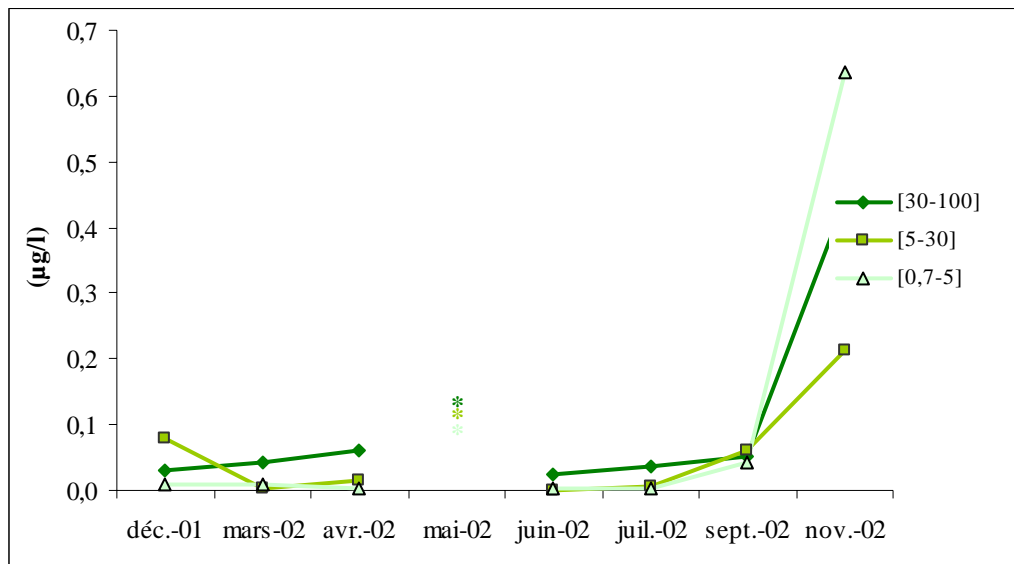


Figure IV 9 : Concentration en chlorophylle a (µg/l) dans les différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]).

* : données manquantes.

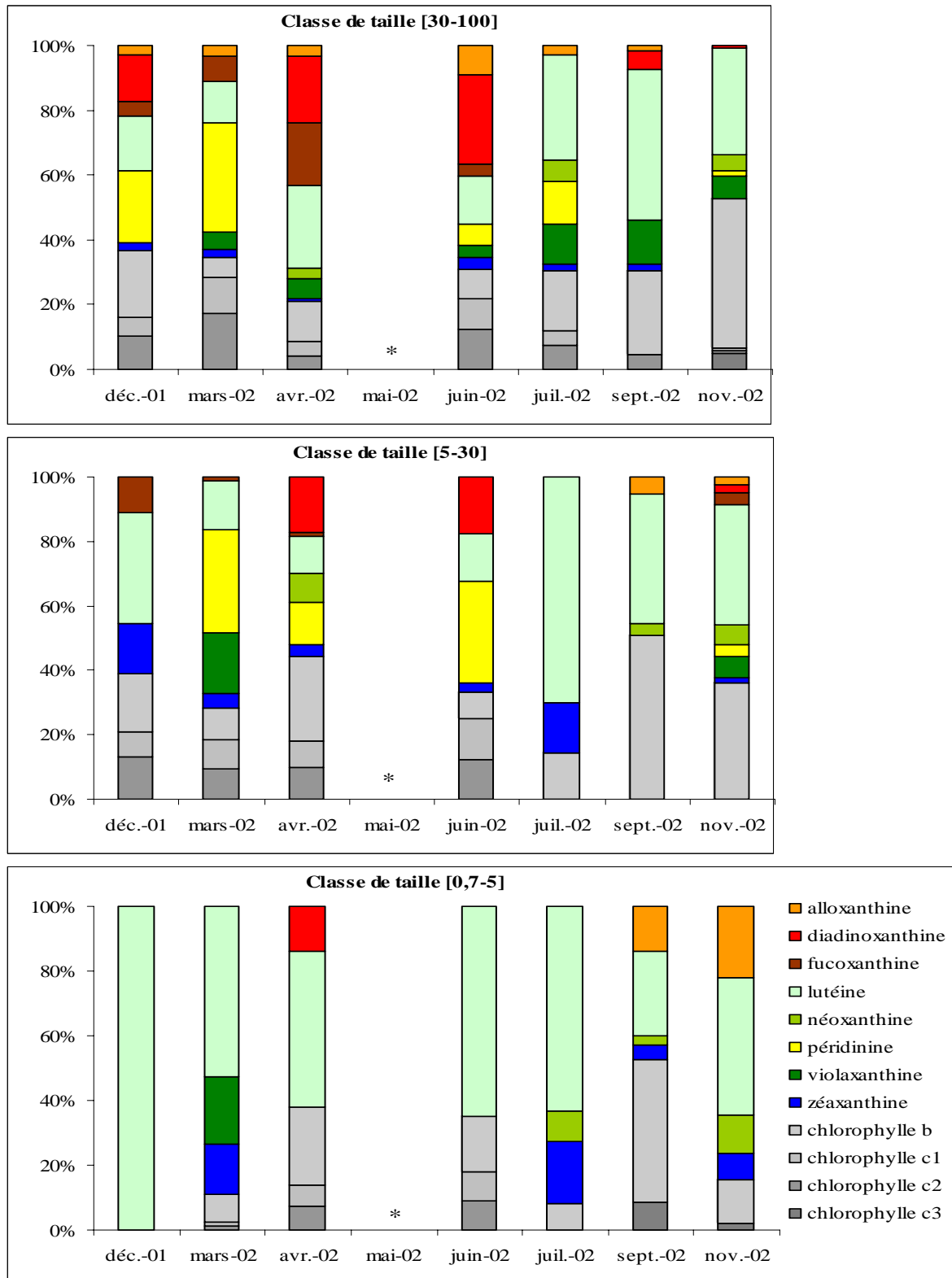


Figure IV 10 : Variations saisonnières de l'importance relative des pigments marqueurs autres que la chlorophylle a extraits des différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]).
* : données manquantes.

4. Composition en stérols des différentes classes de taille

Les concentrations en stérols totaux (Fig. IV 11) suivent des tendances différentes dans chacune des trois classes de taille. Dans la fraction [0,7-5], la teneur en ST est relativement élevée (en moyenne 16,8 ng/l sur la période d'étude) ; elle est stable (environ 9 ng/l) jusqu'au mois de juillet, puis augmente à partir de septembre pour atteindre une valeur maximale de 49,6 ng/l en novembre. Les variations saisonnières de la concentration en stérols totaux extraits de cette classe de taille sont également fortement corrélées aux variations de biomasse des microorganismes eucaryotes ($r=0,94$, $p<0,002$, $n=7$), seuls organismes capables de synthétiser des stérols *de novo*.

C'est dans la classe de taille [5-30] que la concentration en stérols totaux est la plus faible (moyenne = 4,6 ng/l). Jusqu'au mois de juin, ces teneurs ne dépassent pas 2,7 ng/l, elles augmentent ensuite progressivement pour atteindre 11,7 ng/l en novembre. Ces concentrations en stérols sont ici aussi corrélées à la biomasse eucaryote de cette classe de taille ($r=0,84$, $p<0,02$, $n=7$).

La fraction [30-100] présente une concentration en ST moyenne de 14,2 ng/l, avec des teneurs maximales observées en juin (20,8 ng/l) et en automne (19,8 ng/l en septembre, 32 ng/l en novembre). Aucune corrélation n'a pu être obtenue entre les variations des teneurs en stérols totaux et celles de la biomasse eucaryote de la classe de taille [30-100] ($r=0,42$, $p<0,4$, $n=7$) ; il est probable qu'au cours des filtrations différentielles, certains organismes zooplanctoniques de petite taille (nauplii de copépodes, rotifères) sont passés au travers des filtres de 100µm. Etant donné que le zooplancton a été comptabilisé à part (chapitre III), sans filtrations différentielles, nous ne pouvons exclure leur présence aléatoire dans certains échantillons de la classe de taille [30-100], ce qui pourrait expliquer l'absence de corrélation entre la biomasse eucaryote estimée à partir des comptages de protozoaires et de phytoplancton et la concentration en stérols totaux dans cette classe de taille.

Dans l'ensemble, les compositions relatives en stérols des trois classes de taille (Tab. IV 6, 7, 8) se caractérisent par de fortes proportions de cholestérol. Deux autres stérols sont bien représentés, il s'agit du stigmastérol et du β -sitostérol qui constituent respectivement de 4,3 à 59,9% et de 7,2 à 50,4% des stérols totaux dans les trois classes de taille. Enfin, plusieurs autres stérols sont présents en concentrations assez faibles voire nulles quelle que soit la classe de taille ou la date d'échantillonnage considérées, à quelques exceptions près : notamment le campestérol qui constitue 48 % des stérols totaux de la fraction [0,7-5] en mars.

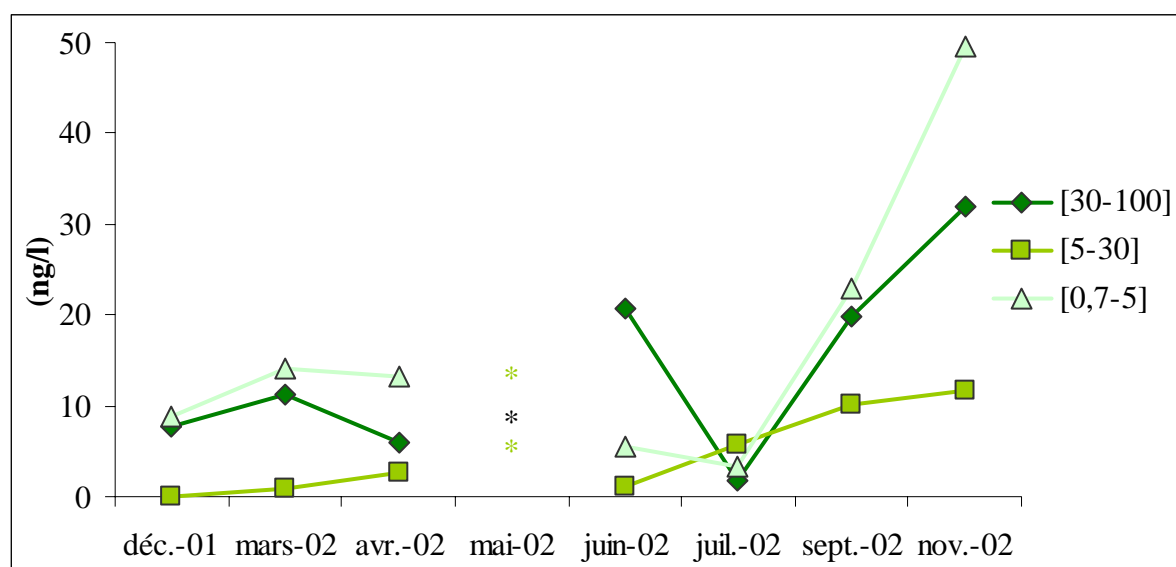


Figure IV 11 : Concentration en stérols totaux (ng/l) dans les différentes classes de taille ([30-100], [5-30], [0,7-5]).

* : données manquantes.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
22-dehydrocholestérol	12,1			*			3,9	
24-Norcholesta-5,22(Z)-dien-3 β -ol								7,4
cholestérol	42,2	76,0	55,1		62,3	49,6	48,3	27,6
24-Methylcholesta-5,22(E)-dien-3 β -ol			10,6					
lathostérol			6,3		7,8			
campestérol	16,6	8,4	6,7		8,3		3,9	22,5
stigmastérol	12,8	7,6	8,6		7,2		4,3	7,8
épistérol			6,4					
β -sitostérol	16,3	8,0			7,2	50,4	39,4	34,7
fucoistérol					7,2			
Δ 22 NI			6,3					

Tableau IV 6 : Composition en stérols (en pourcentage du poids des stérols totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [30-100].

* : données manquantes ; Δ 22 NI : stérol en Δ 22 non identifié.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
22-dehydrocholestérol				*		7,4		
24-Norcholesta-5,22(Z)-dien-3 β -ol							9,5	
cholestérol		52,6	33,4		70,2	6,8	48,9	24,3
24-Methylcholesta-5,22(E)-dien-3 β -ol						13,0		
lathostérol			17,4					
campestérol			18,6			7,1	18,0	23,6
stigmastérol			14,6			41,4	9,2	23,4
β -sitostérol		47,4	16,0		29,8	24,4	14,4	28,8

Tableau IV 7 : Composition en stérols (en pourcentage du poids des stérols totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [5-30].

* : données manquantes.

Date	déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02	sept.-02	nov.-02
22-dehydrocholestérol		8,9	4,7	*				
24-Norcholesta-5,22(Z)-dien-3 β -ol			4,1		10,5		14,2	
cholestérol	34,7	7,7	6,2		20,7	100,0	20,9	45,5
campestérol		48,0			10,6		15,9	18,3
stigmastérol	33,1	7,1	59,9		10,4		14,5	16,9
épistérol		6,7	7,5		13,4			
β -sitostérol	32,2	14,9	8,4		12,0		17,5	19,3
fucoistérol		6,7	4,5		12,0		17,0	
Δ 22 NI			4,7		10,4			

Tableau IV 8 : Composition en stérols (en pourcentage du poids des stérols totaux) des lipides totaux extraits de la classe de taille [0,7-5].

* : données manquantes ; Δ 22 NI : stérol en Δ 22 non identifié.

5. Identification des marqueurs chémotaxonomiques

a. Bactéries hétérotrophes et picocyanobactéries

- Pigments

La composition pigmentaire des cyanobactéries est caractérisée par la présence de myxoxanthophylle, d'échinénone et de zéaxanthine (Mantoura & Llewellyn, 1983 ; Millie et al., 1993). La myxoxanthophylle et l'échinénone sont plutôt caractéristiques des cyanobactéries filamenteuses d'eau douce, et ne sont généralement pas rencontrés chez les picocyanobactéries (Nichols, 1973). Lors de l'analyse des échantillons de MOP provenant du lac de La Godivelle-d'en-Haut, nous n'avons jamais identifié ces deux pigments, ce qui est en accord avec les données de la littérature puisqu'il y a peu ou pas de cyanobactéries filamenteuses dans nos échantillons. En revanche, la zéaxanthine se rencontre chez toutes les cyanobactéries, chez les prochlorophytes, les rhodophytes ; elle est aussi présente chez les chlorophycées (Jeffrey & Vesk, 1997), mais à des concentrations très faibles (de l'ordre de 0,1% des pigments totaux selon Schagerl et al., 2003). Nous avons donc envisagé d'utiliser ce caroténoïde afin de caractériser la biomasse des cyanobactéries nano- et picoplanctoniques présentes au sein des trois classes de taille. En raison des faibles biomasses de cyanobactéries observées dans les fractions [30-100] et [5-30], nous n'avons pas pu dégager de corrélation significative entre les variations des teneurs en zéaxanthine et celles des biomasses de cyanobactéries dans ces deux classes de taille (Tab. IV 9). Par contre, les fortes biomasses de picocyanobactéries rencontrées au sein de la classe de taille [0,7-5] sont apparues significativement corrélées ($r=0,82$, $p<0,05$, $n=7$) aux teneurs en zéaxanthine détectées au sein de cette fraction (Tab. IV 9, Fig. IV 12). L'ajout de la biomasse des chlorophycées à celle des cyanobactéries n'a pas amélioré les corrélations obtenues avec la biomasse des cyanobactéries seules pour chaque classe de taille. De ce fait, et puisqu'il n'a été dénombré aucun rhodophyte ou prochlorophyte au cours des comptages, la zéaxanthine peut ici être considérée comme un

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=7)
Zéaxanthine	0,31	-0,24	0,82 *

Tableau IV 9 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en zéaxanthine (ng/l) et la biomasse des cyanobactéries nano- et picoplanctoniques ($\mu\text{g C/l}$) des différentes classes de taille.

* : significatif au seuil 5% ; n : nombre de dates disponibles.

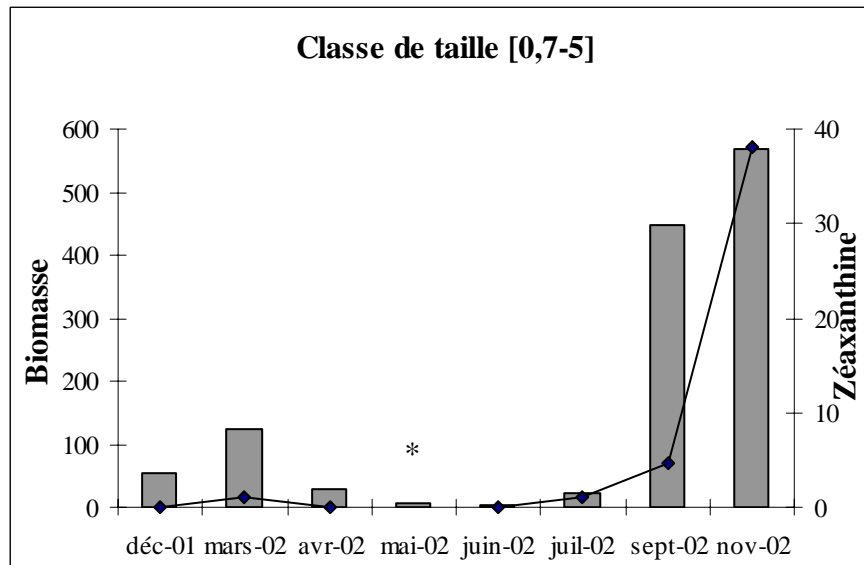


Figure IV 12 : Relation entre la concentration en zéaxanthine (ng/l) et la biomasse des picocyanobactéries ($\mu\text{g C/l}$) dans la classe de taille [0,7-5].

* : donnée manquante.

marqueur satisfaisant des cyanobactéries pico- et nanoplanctoniques seules lorsqu'elles sont présentes en densité suffisante.

- Acides gras

L'étude des compositions en AG des cyanobactéries et des bactéries hétérotrophes ont donné lieu à de nombreux travaux ; ces deux groupes ne peuvent pas, à de très rares exceptions, synthétiser d'AGPI à 20 et 22 atomes de carbone (Sargent et al., 1995). De nombreux auteurs préconisent l'utilisation de certains AG pour caractériser la biomasse de ces deux groupes de procaryotes. Par exemple, Claustre et al. (1992) proposent comme marqueurs la somme des AG à 15 et 17 atomes de carbone (C15 + C17), ou encore le rapport (iso 15:0 + ante 15:0) / 15:0. Il est en effet démontré que les principaux AG des bactéries hétérotrophes sont les AGR et le 18:1(n-7) (Perry et al., 1979 ; Volkman et al., 1980b ; Parkers & Taylor, 1983 ; Desvilettes et al., 1997a), alors que les cyanobactéries, à l'inverse des bactéries hétérotrophes, peuvent synthétiser des AGPI à 18 atomes de carbone tels que le 18:3(n-3), le 18:3(n-6) ou le 18:2(n-6) (Sargent et al., 1987 ; Napolitano, 1998). A l'issue de notre étude, nous proposons d'utiliser la somme des concentrations des AG en C15 et C17 (C15 + C17) pour caractériser les biomasses des cyanobactéries et des bactéries hétérotrophes (Fig. IV 13 B). Ainsi, les coefficients de corrélation de Pearson obtenus entre la biomasse de ces organismes et la somme des concentrations des AG en C15 et C17 au sein de la classe de taille [0,7-5] (Tab. IV 10) sont plus élevés si l'on considère ces deux groupes d'organismes dans leur ensemble.

De plus, nous avons noté une forte corrélation entre la biomasse des HNF dans la classe de taille [5-30] et la concentration des AG en C15 + C17 de cette classe de taille (Tab. IV 10, Fig. IV 13 A), alors que la biomasse des cyanobactéries et des bactéries hétérotrophes est très faible dans cette classe de taille. Ceci suggère que les HNF de cette classe de taille exercent une importante activité phagotrophe sur les picocyanobactéries et les bactéries hétérotrophes

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=8)
HNF	0,09	0,91 **	0,51
Cyanobactéries	-0,31	-0,62	0,82 *
Bactéries hétérotrophes	-	-	0,5
Picocyanobactéries + Bactéries hétérotrophes	-	-	0,85 **

Tableau IV 10 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre la somme des concentrations en acides gras à 15 et 17 atomes de carbone (C15 + C17, ng/l) et la biomasse totale des cyanobactéries nano- et picoplanctoniques, des bactéries hétérotrophes et des HNF ($\mu\text{g C/l}$) des différentes classes de taille.

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

n : nombre de dates disponibles.

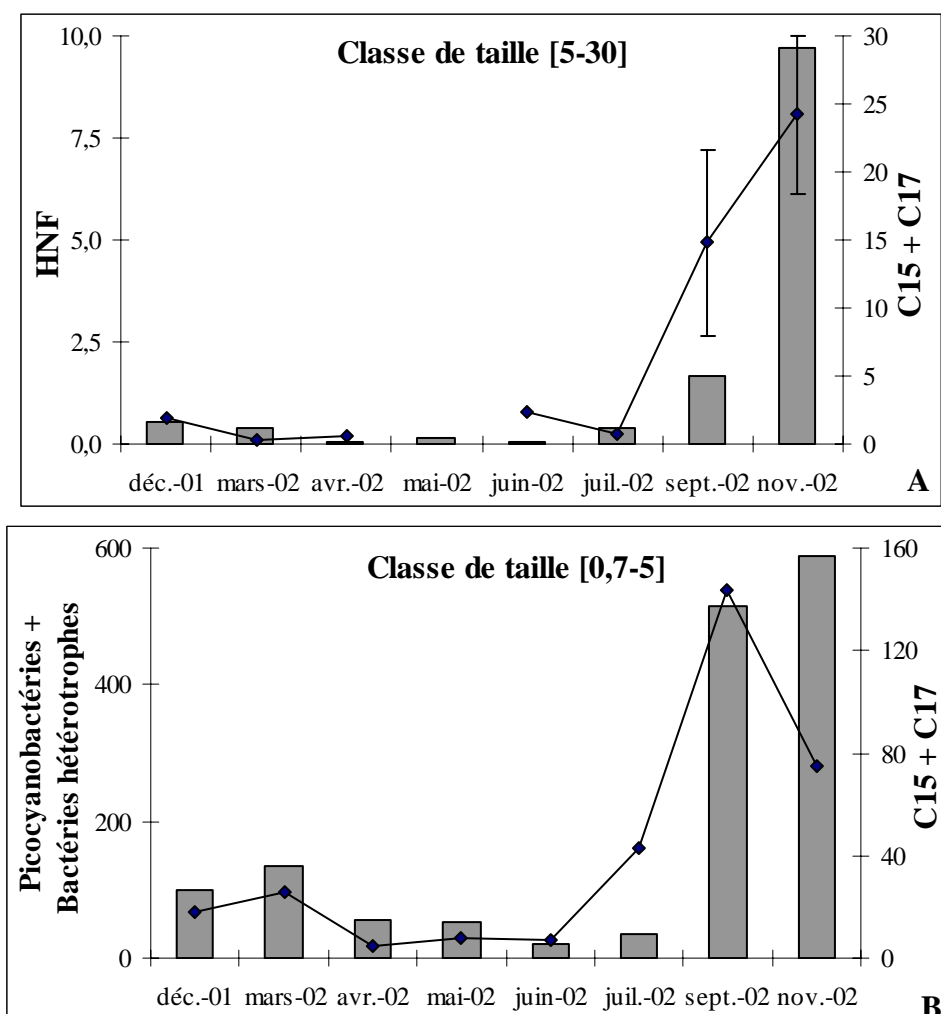


Figure IV 13 : Relations entre la somme des concentrations en acides gras à 15 et 17 atomes de carbone (C15 + C17, ng/l) et la biomasse des HNF ($\mu\text{g C/l}$) dans la classe de taille [5-30] (A) et la biomasse des picocyanobactéries et des bactéries hétérotrophes ($\mu\text{g C/l}$) dans la classe de taille [0,7-5] (B).

* : donnée manquante.

dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut et accumulent des AG bactériens. L'absence de corrélation obtenue entre ces protozoaires et la concentration en C15 + C17 dans la classe de taille [30-100] ainsi que les différences que nous avons observées dans la composition taxonomique des HNF au sein de chaque classe de taille laissent penser que ces organismes pourraient probablement avoir une activité plus omnivore voire totalement algivore dans la classe de taille [30-100].

b. Dinophycées

- Pigments

La composition pigmentaire des dinophycées autotrophes est caractérisée par la présence de deux caroténoïdes particuliers à cette classe d'algues, la dinoxanthine et la péridinine (Jeffrey & Vesk, 1997), ce dernier composé étant communément utilisé en tant que marqueur chémotaxonomique car il est généralement présent en quantités importantes chez ces organismes. Dans ce contexte, nous avons recherché l'existence de relations statistiques entre les concentrations en péridinine et les biomasses des dinophycées autotrophes (formes non enkystées) dans chaque classe de taille (Fig. IV 14). Pour les fractions [30-100] et [5-30], nous avons obtenu des corrélations significatives entre la concentration en péridinine et la biomasse des dinophycées autotrophes (Tab. IV 11). Dans la classe de taille [0,7-5], la péridinine n'a jamais été détectée dans nos échantillons ; de plus, lors des comptages de phytoplancton effectués dans cette classe de taille, nous n'avons observé que des formes enkystées de dinophycées, ce qui explique l'absence de péridinine (marqueur des dinophycées autotrophes) dans ces échantillons.

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=7)
Péridinine	0,71	0,97 **	-

Tableau IV 11 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en péridinine (ng/l) et la biomasse des dinophycées autotrophes ($\mu\text{g C/l}$) des différentes classes de taille.

** : significatif au seuil 1% ;

n : nombre de dates disponibles.

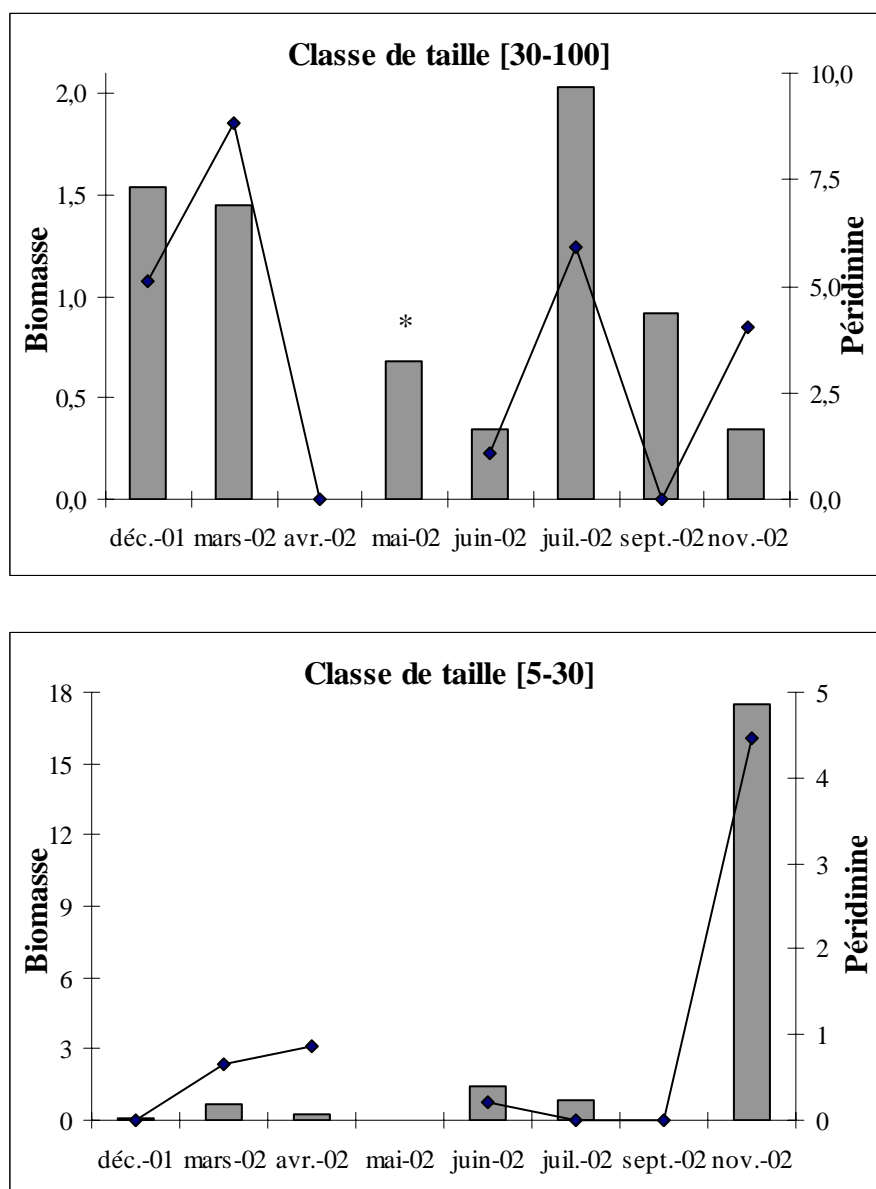


Figure IV 14 : Relations entre la concentration en péridinine (ng/l) et la biomasse des dinophycées autotrophes ($\mu\text{g C/l}$) des classes de taille [30-100] et [5-30].

* : données manquantes.

- Acides gras

La composition en AG des dinophycées est généralement marquée par de fortes teneurs en 18:5(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) (Mayzaud et al., 1976 ; Bourdier, 1985 ; Holz & Conner, 1987 ; Ahlgren et al., 1992 ; Conte et al., 1994 ; Sargent et al., 1995). Ces AG étant aussi présents en quantités importantes chez les chrysophycées et les cryptophycées, il est difficile de caractériser les variations de biomasse des dinophycées à l'aide de ces AG. En eau douce, le seul réel marqueur de ces algues est le 18:5(n-3), AG présent à certaines périodes du cycle cellulaire des dinophycées (Sargent et al., 1995) ; toutefois, ce composé n'a jamais été détecté dans nos échantillons.

- Stérols

La composition en ST de certaines dinophycées est caractérisée par la présence de dinostérol (Nichols et al., 1983). Ce stérol n'a pu être détecté en CPG-SM probablement parce qu'il était présent en concentrations inférieures à la limite de détection de la méthode d'analyse. Par conséquent, ce composé ne peut être ici utilisé en tant que marqueur de ce groupe phytoplanctonique.

c. Cryptophycées

- Pigments

La composition pigmentaire de cette classe d'algues est caractérisée par de fortes concentrations en alloxanthine et en chlorophylles *a* et *c*₂ (Jeffrey & Vesk, 1997). Ces chlorophylles étant aussi présentes chez d'autres groupes phytoplanctoniques, l'alloxanthine est le seul pigment pouvant réellement être utilisé en tant que marqueur des cryptophycées car il n'est rencontré chez aucun autre taxon (Wright & Shearer, 1984 ; Gieskes & Kray, 1986). Au cours de cette étude, les faibles coefficients de corrélation de Pearson obtenus entre la

biomasse de ces algues et la concentration en alloxanthine dans chaque classe de taille (Tab. IV 12) suggèrent que ce pigment ne peut ici être utilisé pour caractériser les cryptophycées des classes de taille [5-30] et [30-100], alors que sa concentration est corrélée à la biomasse de ces algues dans la fraction [0,7-5] (Fig. IV 15). Lors des comptages réalisés dans chaque classe de taille, nous avons pu observer que les cryptophycées de la fraction [0,7-5] étaient essentiellement constituées de cellules du genre *Cryptomonas* alors que celles des classes de taille [5-30] et [30-100] étaient surtout représentées par ces cellules du genre *Rhodomonas* ; ces différences de composition taxonomique pourraient en partie expliquer les résultats divergents obtenus lors des corrélations réalisées entre la biomasse de ces algues et la concentration en alloxanthine au sein de chaque classe de taille du fait d'une concentration par unité de biomasse différente selon les espèces. De plus, les biomasses de cryptophycées sont relativement faibles tout au long de l'étude dans les fractions supérieures à 5µm ; en conséquence, les concentrations en alloxanthine ont souvent été en deçà de la limite de détection de la méthode d'analyse en HPLC.

- Acides gras et stérols

Les compositions en AG et en ST des cryptophycées ne présentent pas de composés marqueurs de cette classe phytoplanctonique, car elles sont caractérisées par de fortes teneurs en AG 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) présents aussi chez les dinophycées et les chrysophycées (Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998) et en 24-methylcholesta-5,22-(E)-dien-3β-ol qu'elles partagent avec les diatomées (Volkman, 2003).

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=7)
Alloxanthine	0,66	0,21	0,91 *

Tableau IV 12 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en alloxanthine (ng/l) et la biomasse des cryptophycées ($\mu\text{g C/l}$) des différentes classes de taille.

* : significatif au seuil 5% ;

n : nombre de dates disponibles.

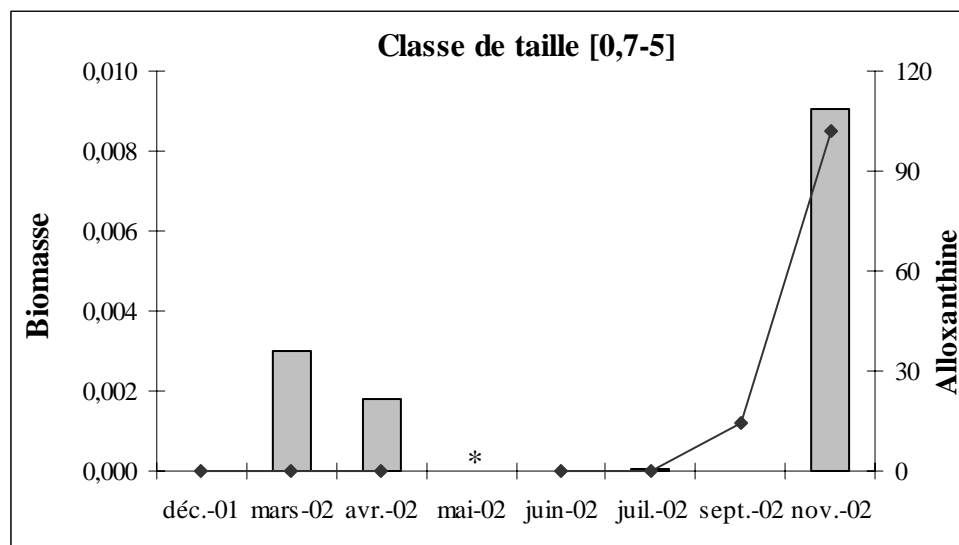


Figure IV 15 : Relation entre la concentration en alloxanthine (ng/l) et la biomasse des cryptophycées ($\mu\text{g C/l}$) au sein de la classe de taille [0,7-5].

* : donnée manquante.

d. Chrysophycées

A notre connaissance, il n'a pas été décrit de composés marqueurs fiables pour cette classe d'algues. En effet, leur composition pigmentaire est marquée par de fortes concentrations en chlorophylles a , c_1 et c_2 , en 19'-butanoyloxyfucoxanthine, en diadinoxanthine et en fucoxanthine, pigments partagés par de nombreuses autres algues (Andersen et al., 1996 ; Jeffrey & Vesk, 1997) ; les AG majoritaires sont le 18:4(n-3), le 20:5(n-3) et le 22:6(n-3) (Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998), comme chez les cryptophycées et les dinophycées ; les chrysophycées présentent du stigmastérol en concentrations non négligeables, stérol qu'elles partagent avec les chlorophycées. Nous avons alors tenté de comparer les concentrations en ce composé avec la somme des biomasses des chrysophycées et des chlorophycées pour chaque classe de taille. Les coefficients de corrélation obtenus dans ce cas étaient inférieurs à ceux obtenus avec la biomasse des chlorophycées seules (Tab. IV 15). Dans ce contexte, il ne semble pas possible de caractériser la biomasse des chrysophycées à l'aide des stérols dans le cadre de notre étude.

e. Diatomées

Le pigment marqueur des diatomées est la chlorophylle c_1 ; ces algues présentent également de fortes teneurs en fucoxanthine, diadinoxanthine et diatoxanthine (Wright & Shearer, 1984 ; Quiblier et al., 1994 ; Jeffrey & Vesk, 1997), mais ces composés sont partagés par d'autres algues phytoplanctoniques. Leur composition en AG est caractérisée par des teneurs élevées en 20:5(n-3), par la présence de 20:4(n-6) et de 22:6(n-3), mais surtout par les AGPI à 16 atomes de carbone tels que le 16:2(n-4), le 16:2(n-7), le 16:3(n-4), et le 16:4(n-1) qui sont des marqueurs assez fiables de cette classe d'algues (Volkman et al., 1981 ; Sicko-Goad et al., 1988 ; Dunstan et al., 1994 ; Lévillé et al., 1997 ; Pond et al., 1998). Le stérol

marqueur des diatomées est le trans-22-dehydrocholestérol, qui peut représenter jusqu'à 70-80% des stérols totaux (Orcutt & Patterson, 1975 ; Volkman et al., 1980a), et par le 24-methylcholesta-5,22-(E)-dien-3 β -ol qu'elles partagent avec les cryptophycées (Volkman, 1986).

Etant donné les très faibles biomasses de diatomées rencontrées au sein des différentes classes de taille tout au long de l'étude, nous n'avons pu obtenir aucune corrélation significative entre chacun de ces marqueurs et la biomasse de ces algues au sein des différentes classes de taille.

f. Chlorophycées

- Pigments

Les pigments majoritaires des chlorophycées sont la chlorophylle *b*, la lutéine, la violaxanthine et la néoxanthine (Hooks et al., 1988 ; Jeffrey & Vesk, 1997). La lutéine est uniquement rencontrée chez les chlorophycées ; elle est donc généralement utilisée en tant que pigment marqueur de cette classe d'algues. Les euglénophycées peuvent également contenir de fortes teneurs en chlorophylle *b* et néoxanthine (Jeffrey & Vesk, 1997), mais étant donné la faible densité de ce groupe phytoplanctonique dans les écosystèmes marins ou lacustres, de nombreux auteurs considèrent que ces deux pigments peuvent caractériser de manière satisfaisante la biomasse des chlorophycées seules. De la même manière, la violaxanthine est aussi présente en importantes quantités chez les stigmatophytes (Jeffrey & Vesk, 1997) ; elle ne peut donc pas être associée à la biomasse des chlorophycées seules et c'est pour cela qu'elle n'est jamais utilisée en tant que marqueur chémotaxonomique. La figure IV 16 montre la relation entre les concentrations en chlorophylle *b*, lutéine et néoxanthine et la biomasse des chlorophycées au sein de chaque classe de taille. Les corrélations significatives obtenues entre chacun de ces pigments et la biomasse de chlorophycées dans les différentes classes de taille (Tab. IV 13) montrent que ces pigments peuvent être utilisés dans

notre étude en tant que marqueurs de ce groupe phytoplanctonique (Tab. IV 13). Comme nous l'avons vu précédemment, les euglénophycées ont une signature pigmentaire proche des chlorophycées du fait que leurs pigments majoritaires sont la chlorophylle *b* et la néoxanthine. Par conséquent, nous avons réalisé des corrélations entre les concentrations en ces deux pigments dans chaque classe de taille et la somme des biomasses de chlorophycées et d'euglénophycées correspondantes. Etant donné les faibles biomasses d'euglénophycées rencontrées tout au long de l'étude et pour chaque classe de taille, la prise en compte de ce groupe phytoplanctonique n'a eu aucun effet sur les valeurs des coefficients de corrélation de Pearson obtenues pour les chlorophycées seules. Dans ce contexte, il semble que la chlorophylle *b*, la lutéine et la néoxanthine peuvent ici être considérées comme des marqueurs satisfaisants de la biomasse des chlorophycées.

- Acides gras

La composition en AG des chlorophycées est caractérisée par de fortes teneurs en 18:3(n-3), 18:4(n-3), 16:4(n-3), 16:2(n-6), 16:3(n-3) (Volkman et al., 1979 ; Johns et al., 1979 ; Scribe et al., 1991 ; Pohl, 1982) et par l'absence ou la présence sous forme de traces d'AGPI à 20 et 22 atomes de carbone (Sargent et al., 1987 ; Ahlgren et al., 1990). Plusieurs études ont associé les variations des concentrations en 18:3(n-3) à celles des euchlorophycées (Ackman et al., 1968 ; Pionetti et al., 1986 ; Dunstan et al., 1992), ou encore le rapport 18:3(n-3) / Σ AGPI à 20 et 22 atomes de carbone ("rapport euchlorophycées", Desvillettes, 1994). Plus récemment, Lévillé et al. (1997) ont considéré que la somme des AG 16:3(n-3), 18:3(n-3) et 20:4(n-3) ("somme euchlorophycées") pouvait caractériser cette classe d'algues. Nous avons donc comparé l'évolution temporelle du 18:3(n-3), du "rapport euchlorophycées" et de la "somme euchlorophycées" des trois classes de taille avec celle des biomasses de chlorophycées correspondantes (Fig. IV 17). Les corrélations obtenues entre ces divers

paramètres (Tab. IV 14) montrent que l'utilisation du rapport et de la somme euchlorophycées ne semble pas pouvoir s'appliquer à la classe de taille [0,7-5] alors que de bonnes corrélations ont été obtenues avec les classes de taille [5-30] et [30-100]. L'absence de corrélation dans la classe de taille [0,7-5] semble être liée aux faibles concentrations en 18:3(n-3) obtenues en novembre alors que la biomasse des chlorophycées est importante à cette date ; étant donné l'absence de réplicats dans cette classe de taille, il est possible qu'il y ait eu un problème lors de l'analyse en CPG pour cette date d'échantillonnage. Toutefois, les concentrations en 18:3(n-3) semblent pouvoir caractériser de façon satisfaisante la biomasse des chlorophycées dans notre étude.

- Stérols

La composition en stérols de ce groupe phytoplanctonique est complexe (Iatrides et al., 1983). Certaines chlorophycées peuvent présenter des teneurs importantes en stigmastérol, en campestérol et en β -sitostérol (Volkman, 1986). Nous avons donc comparé l'évolution temporelle des concentrations de ces trois stérols avec la biomasse des chlorophycées dans chacune des trois classes de taille de la MOP (Fig. IV 18, Tab. IV 15). Ainsi, le β -sitostérol et le campestérol semblent bien caractériser la biomasse de cette classe phytoplanctonique car nous avons obtenu pour chaque fraction de la MOP des corrélations hautement significatives. Par contre, les variations en stigmastérol sont peu corrélées à celles de la biomasse des chlorophycées. Dans cette étude, les teneurs en β -sitostérol et en campestérol semblent donc être des marqueurs satisfaisants de la biomasse des chlorophycées.

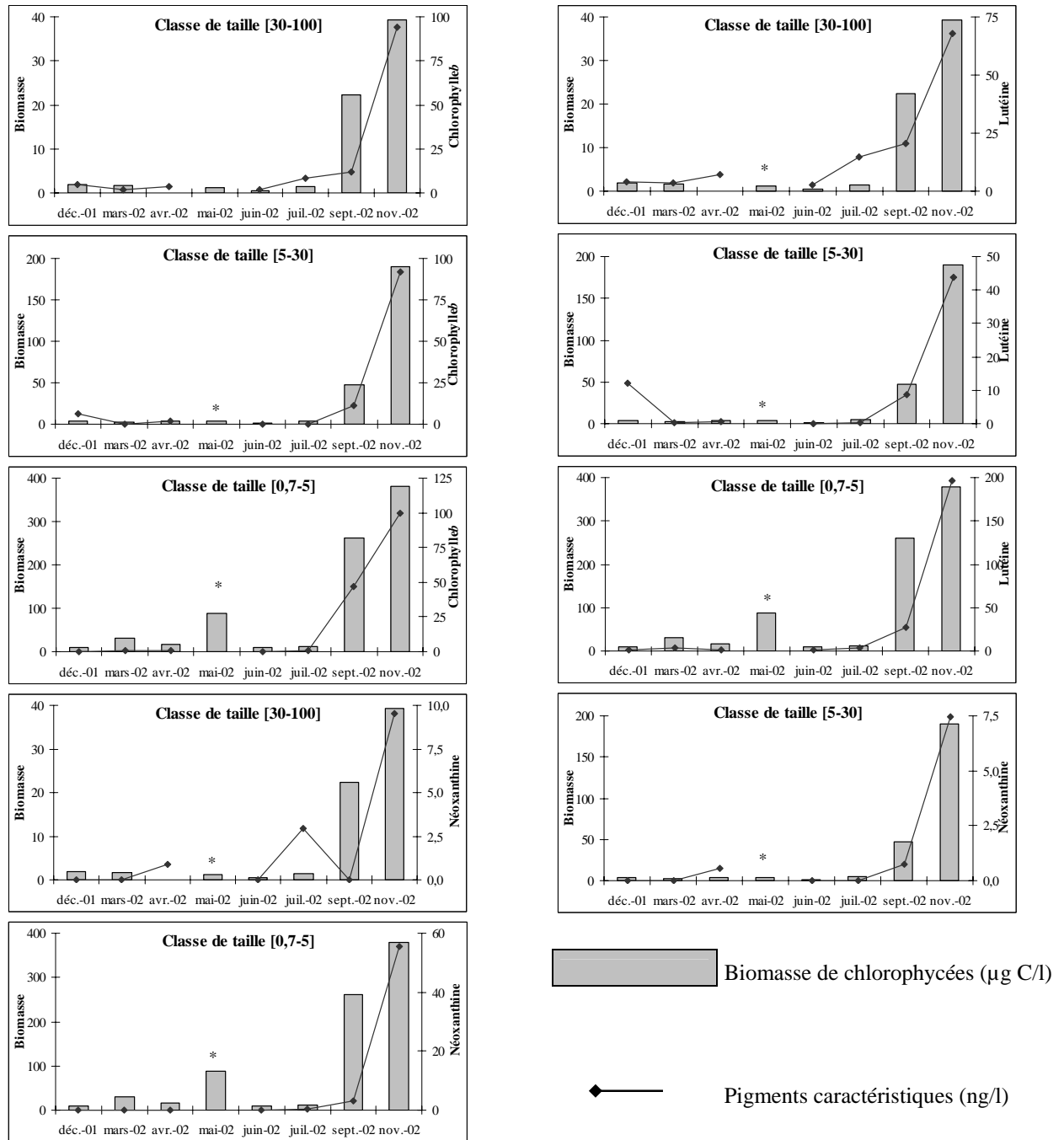


Figure IV 16 : Relation entre les concentrations en pigments caractéristiques des chlorophycées (chlorophylle b, néoxanthine, lutéine) (ng/l) et les biomasses de chlorophycées (µg C/l) au sein des classes de taille [30-100], [5-30] et [0,7-5].
* : données manquantes.

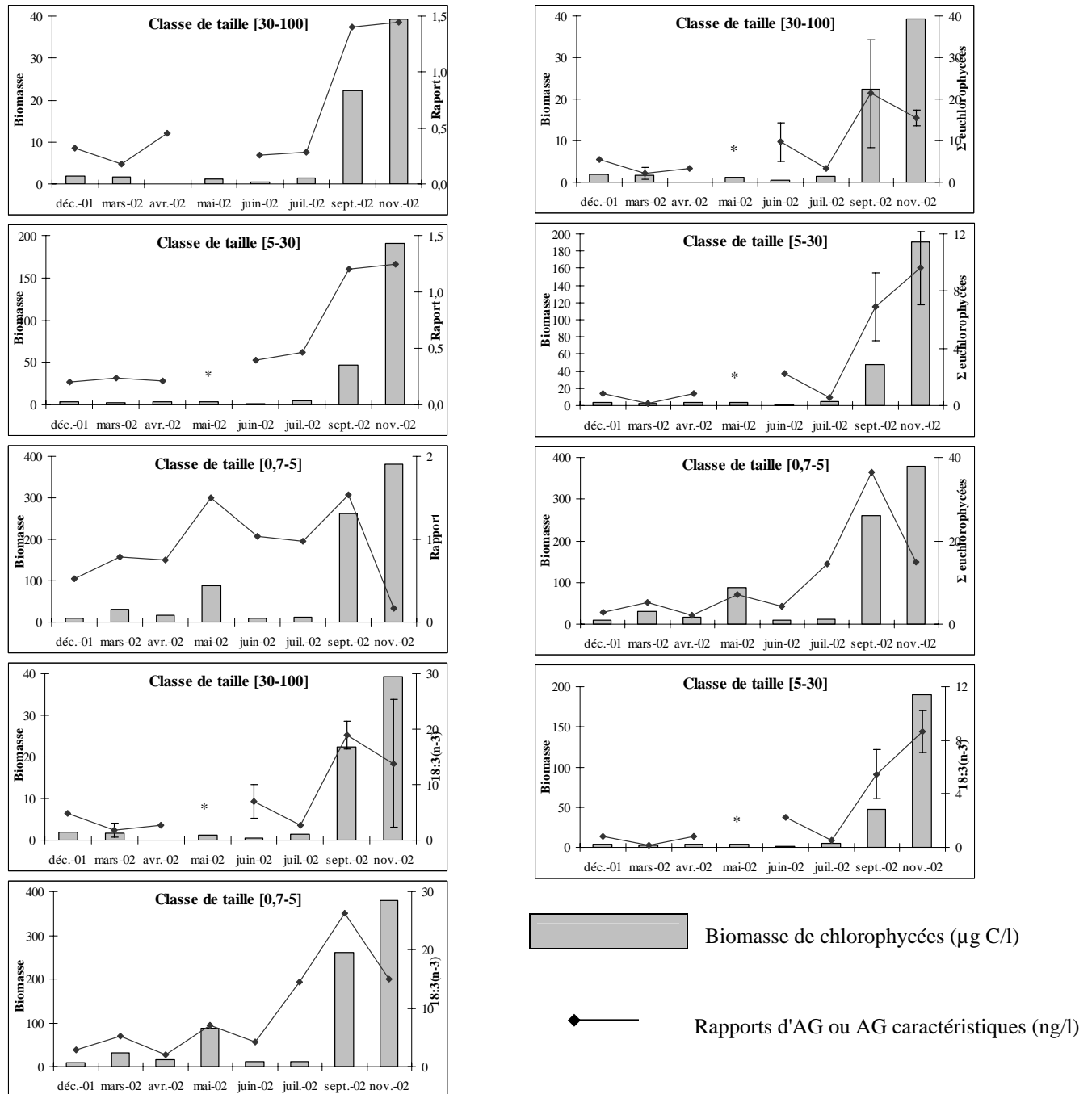


Figure IV 17 : Relation entre les concentrations (ng/l) en AG ou rapports d'AG caractéristiques des chlorophycées (rapport euchlorophycées, somme euchlorophycées, 18:3(n-3)) et les biomasses de chlorophycées (µg C/l) au sein des classes de taille [30-100], [5-30] et [0,7-5].

Rapport = Rapport euchlorophycées = $18:3(n-3) / \Sigma \text{ AGPI C20 + C22}$;

Σ euchlorophycées = Somme euchlorophycées = 16:3(n-3)

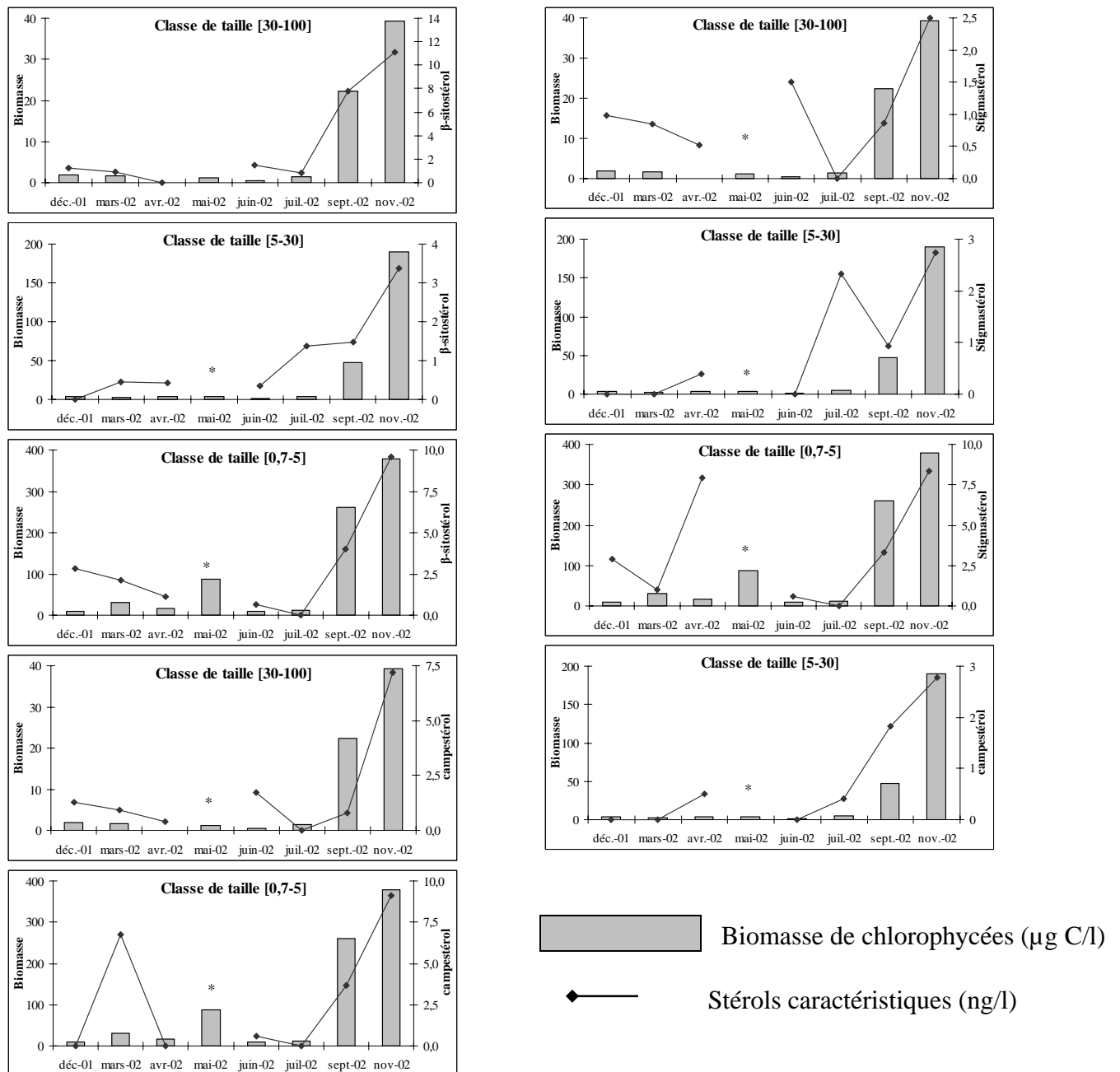


Figure IV 18 : Relation entre les concentrations (ng/l) en stérols caractéristiques des chlorophycées (β-sitostérol, stigmasterol, campesterol) et les biomasses de chlorophycées (μg C/l) au sein des classes de taille [30-100], [5-30] et [0,7-5].
* : données manquantes.

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=7)
Chlorophylle <i>b</i>	0,89 **	0,99 **	0,98 **
Lutéine	0,94 **	0,96 **	0,87 *
Néoxanthine	0,77 *	0,99 **	0,83 *

Tableau IV 13 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en pigments caractéristiques des chlorophycées (ng/l) et la biomasse des chlorophycées (µg C/l) des différentes classes de taille.

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

n : nombre de dates disponibles.

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=8)
Rapport euchlorophycées	0,94 **	0,81 **	-0,16
Somme euchlorophycées	0,79 *	0,90 **	0,66
18:3(n-3)	0,81 *	0,92 **	0,70 *

Tableau IV 14 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les rapports d'AG ou AG caractéristiques des chlorophycées (ng/l) et la biomasse des chlorophycées (µg C/l) des différentes classes de taille.

Rapport euchlorophycées = 18:3(n-3)/Σ AGPI C20 + C22

Somme euchlorophycées = 16:3(n-3) + 18:3(n-3) + 20:4(n-3)

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

n : nombre de dates disponibles.

Classe de taille	[30-100] (n=7)	[5-30] (n=7)	[0,7-5] (n=7)
β-sitostérol	0,99 **	0,93 **	0,92 **
campestérol	0,83*	0,92**	0,74*
stigmastérol	0,72	0,71	0,56

Tableau IV 15 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les concentrations en stérols caractéristiques des chlorophycées (ng/l) et la biomasse des chlorophycées (µg C/l) des différentes classes de taille.

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

n : nombre de dates disponibles.

III. Discussion – Conclusion

L'étude de la MOP du lac de La Godivelle-d'en-Haut a été menée en fonction du cycle biologique de *Mixodiatomus laciniatus* et non dans l'optique d'un véritable suivi saisonnier de la dynamique des populations microbiennes. Les résultats obtenus permettent cependant de dégager plusieurs éléments intéressants.

Tout d'abord, l'évolution de la biomasse et les variations temporelles de la composition taxonomique de la MOP [0,7-100] sont typiques des lacs oligotrophes de montagne. La MOP totale se caractérise par de faibles biomasses sur l'ensemble de l'année (en moyenne 375 µg C/l de décembre à novembre) et par la prédominance des cellules picoplanctoniques qui constituent en moyenne 68% de la MOP totale. Ces cellules picoplanctoniques sont représentées par des bactéries hétérotrophes, des picocyanobactéries et des chlorophycées picoplanctoniques, les picocyanobactéries représentant le groupe microbien majoritaire en terme de biomasse. En ce qui concerne les organismes nano- et microplanctoniques, la communauté microbienne du lac de La Godivelle-d'en-Haut est essentiellement constituée de cryptophycées, de HNF, de chlorophycées et de dinophycées, les autres composantes étant très faiblement représentées en terme de densité et de biomasse tout au long de l'étude. Cette relative simplicité du réseau trophique est en partie liée aux conditions environnementales rencontrées dans cet écosystème et à son statut très oligotrophe (chapitre III). Les conditions de carence en nutriments limitent le développement des algues de grande taille et favorisent celui des cellules de petite taille. Celles-ci ont un rapport surface / volume supérieur à celui des cellules de plus grande taille, qui leur procure un avantage compétitif vis-à-vis des nutriments (Reynolds, 1984 ; Rott, 1988 ; Psenner & Zapf, 1990). Par ailleurs, Carrillo et al. (1995) ont observé un important développement de picocyanobactéries dans un lac de montagne espagnol (La Caldera) ; ils ont alors suggéré que la nature procaryotique de ces cellules leur fournit un avantage compétitif pour exploiter des apports en phosphore

discontinus (Lehman & Sandgren, 1982 ; Carrillo et al., 1991 ; Roloff & Nicklish, 1993) ; elles seraient alors capables d'accumuler plus de nutriments que nécessaire lorsque les concentrations en phosphore dans le milieu sont faibles. Enfin, la prédominance d'algues mixotrophes sur celles strictement autotrophes est observée dans de nombreux lacs de montagne (Medina-Sánchez et al., 1999, 2004 ; Hobbie et al., 2000). La prédominance de ces cellules suggère que la mixotrophie est une stratégie avantageuse en condition de limitation du milieu en nutriments (Medina-Sánchez et al., 2004). En effet, les bactéries ont plus d'affinités pour le phosphore que les algues (Currie & Kalff, 1984) et sont par conséquent plus riches en cet élément que les eucaryotes lorsqu'il devient limitant. Ce phénomène, déjà observé dans des écosystèmes du même type (Medina-Sánchez et al., 1999, 2004 ; Hobbie et al., 2000), pourrait expliquer la structure particulière de la communauté microbienne du lac de La Godivelle-d'en-Haut.

L'analyse des compositions en ST, AG et pigments extraits des différentes classes de taille nous a permis d'attribuer à chacun des principaux groupes taxonomiques de la MOP [0,7-100] (cyanobactéries, bactéries hétérotrophes, HNF, chlorophycées, cryptophycées, dinophycées) un ou plusieurs composés marqueurs (Tab. IV 16). Ces composés pourraient nous permettre de visualiser les flux de matière existant entre ces différents groupes taxonomiques qui constituent l'environnement trophique potentiel de *Mixodiaptomus laciniatus* et les différentes écophases de ce copépode. Toutefois, nous n'avons pas pu identifier de marqueurs chémotaxonomiques pour les composantes minoritaires de la MOP (diatomées, chrysophycées). Les biomasses toujours très faibles de ces deux groupes taxonomiques tout au long de l'étude conduisent à une relative imprécision des comptages ainsi qu'à des problèmes analytiques (limites de détection en HPLC, CPG ou CPG-SM), qui expliquent l'absence de corrélation entre les biomasses de ces taxa et les composés pressentis pour les caractériser. En revanche, l'analyse simultanée des compositions en acides gras,

stérols et pigments nous a permis de caractériser au mieux chacun des taxa majeurs de la MOP. Par exemple, les figures IV 19, IV 20 et IV 21 montrent la relation entre la biomasse des chlorophycées et les concentrations en marqueurs lipidiques et pigmentaires attribués à ce groupe phytoplanctonique au sein des différentes classes de taille. Ces différents composés suivant la même tendance au sein d'une même classe de taille, nous les avons comparé deux à deux à l'aide de corrélations de Pearson (Tab. IV 17, 18, 19). Les résultats obtenus montrent que ces composés sont intimement associés. Toutefois, il semble que l'utilisation du rapport d'AG et de la "somme euchlorophycées" proposés par Desvillettes (1994) et Lévillé et al. (1997) soient moins bien adaptés à notre étude ; ces indices ont été mis au point respectivement dans des milieux eutrophe (bassins de pisciculture) et oligo-mésotrophe (lac Pavin) dont la composition taxonomique des chlorophycées est bien différente de celle observée au lac de La Godivelle-d'en-Haut ; ces divergences pourraient expliquer pourquoi ces deux indices semblent être peu adaptés à notre étude. En effet, nous avons observé des corrélations faibles voire nulles entre ces deux rapports d'AG et la biomasse des chlorophycées (Tab. IV 11, 12, 13), et entre ces rapports et les autres composés caractéristiques des chlorophycées (Tab. IV 17, 18, 19).

Groupes taxonomiques	Marqueurs		
	Pigments	Acides gras	Stérols
Picocyanobactéries	Zéaxanthine	C15 + C17	
Bactéries (auto- et hétérotrophes) et organismes bactérivores		C15 + C17	
Dinophycées	Péridinine		
Cryptophycées	Alloxanthine		
Chlorophycées	Chlorophylle <i>b</i>	Rapport euchlorophycées	β-sitostérol
	Lutéine	Somme euchlorophycées	Campestérol
	Néoxanthine	18:3(n-3)	

Tableau IV 16 : Pigments, acides gras et stérols retenus comme composés marqueurs des principales composantes de la MOP [0,7-100] du lac de La Godivelle-d'en-Haut.

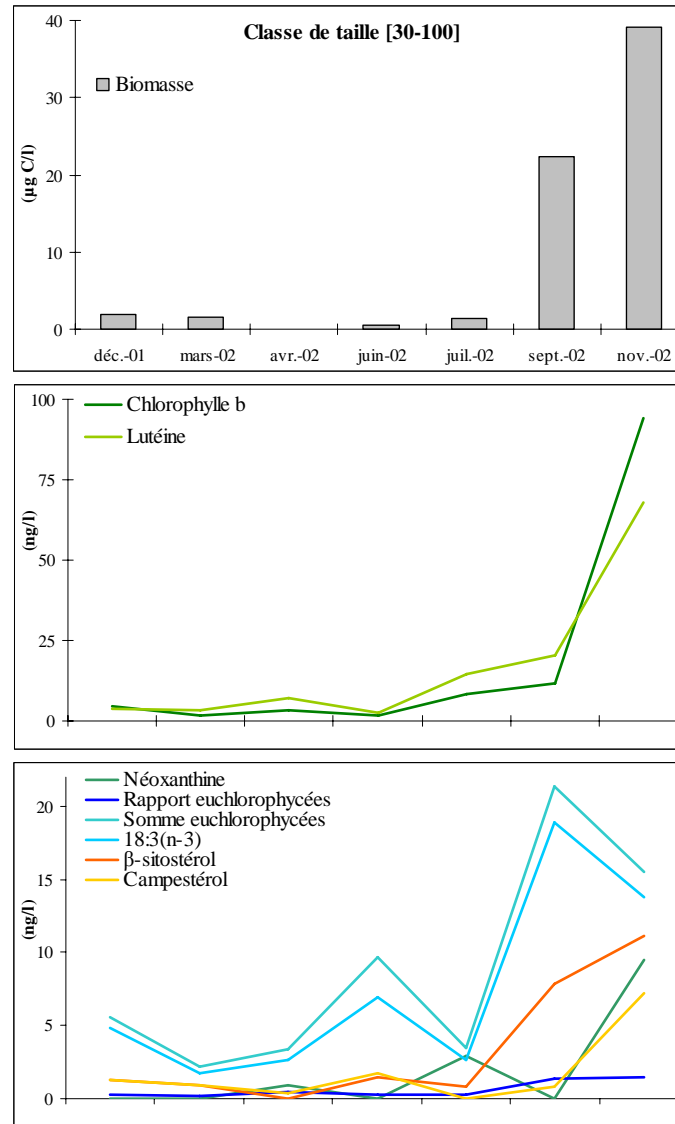


Figure IV 19 : Relation entre la biomasse des chlorophycées (µg C/l) et les concentrations en pigments, acides gras et stérols caractéristiques des chlorophycées (ng/l) au sein de la classe de taille [30-100].

	Chlorophylle <i>b</i>	Lutéine	Néoxanthine	Rapport euchloro. euchloro.	Somme euchloro. euchloro.	18:3(n-3)	β-sitostérol
Lutéine	0,98**						
Néoxanthine	0,96**	0,94**					
Rapport euchlorophycées	0,72	0,81**	0,58				
Somme euchlorophycées	0,47	0,56	0,5	0,90**			
18:3(n-3)	0,5	0,59	0,31	0,92**	0,99**		
β-sitostérol	0,84*	0,89**	0,7	0,95**	0,86**	0,88**	
Campesterol	0,96**	0,90**	0,87*	0,62	0,45	0,46	0,78*

Tableau IV 17 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les différents composés caractéristiques des chlorophycées au sein de la classe de taille [30-100].

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

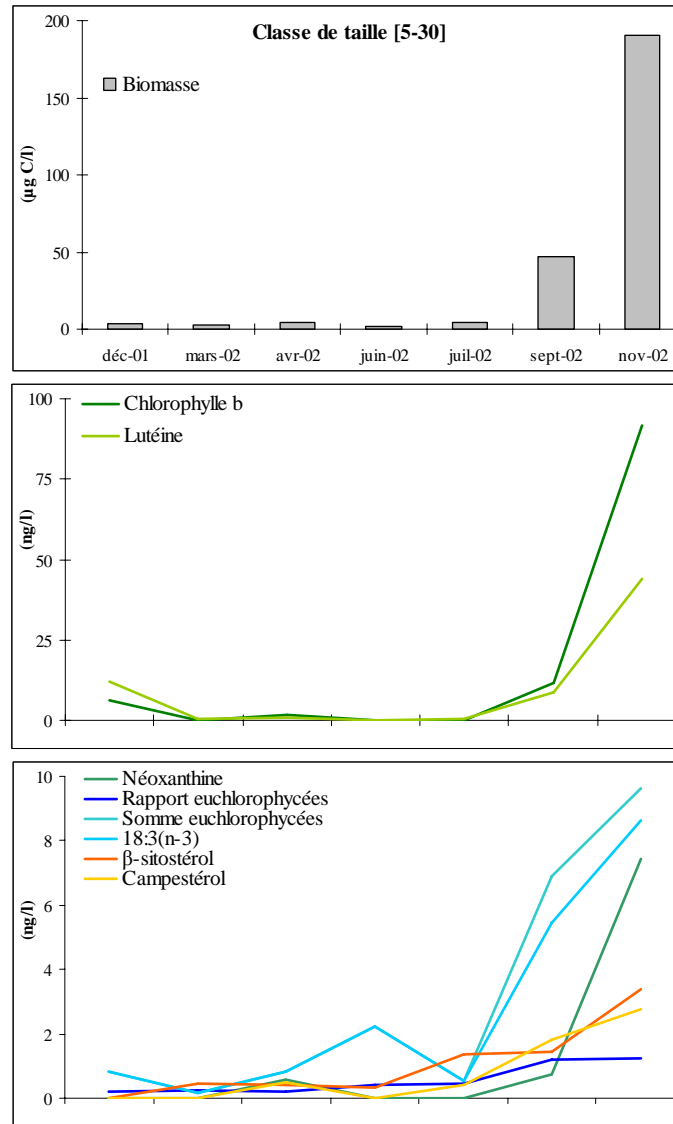


Figure IV 20 : Relation entre la biomasse des chlorophycées ($\mu\text{g C/l}$) et les concentrations en pigments, acides gras et stérols caractéristiques des chlorophycées (ng/l) au sein de la classe de taille [5-30].

	Chlorophylle <i>b</i>	Lutéine	Néoxanthine	Rapport euchloro. euchloro.	Somme euchloro. euchloro.	18:3(n-3)	β -sitostérol
Lutéine	0,98**						
Néoxanthine	0,99**	0,95**					
Rapport euchlorophycées	0,72	0,7	0,71				
Somme euchlorophycées	0,84**	0,83*	0,83*	0,96**			
18:3(n-3)	0,88**	0,86**	0,86**	0,94**	0,99**		
β -sitostérol	0,89**	0,83*	0,90**	0,86**	0,85**	0,87**	
Campesterol	0,86**	0,83*	0,86**	0,94**	0,96**	0,95**	0,92**

Tableau IV 18 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les différents composés caractéristiques des chlorophycées au sein de la classe de taille [5-30].

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

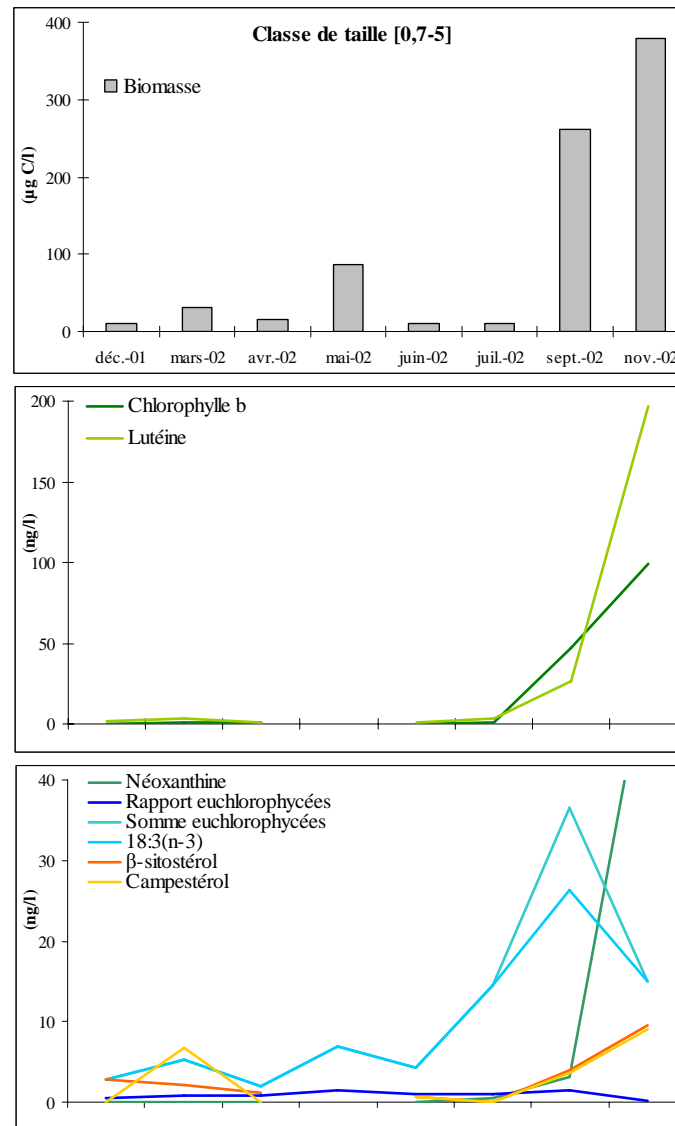


Figure IV 21 : Relation entre la biomasse des chlorophycées (µg C/l) et les concentrations en pigments, acides gras et stérols caractéristiques des chlorophycées (ng/l) au sein de la classe de taille [0,7-5].

	Chlorophylle <i>b</i>	Lutéine	Néoxanthine	Rapport euchloro.	Somme euchloro.	18:3(n-3)	β-sitostérol
Lutéine	0,94**						
Néoxanthine	0,92**	0,99**					
Rapport euchlorophycées	-0,32	-0,59	-0,64				
Somme euchlorophycées	0,53	0,25	0,18	0,41			
18:3(n-3)	0,6	0,35	0,29	0,31	0,98**		
β-sitostérol	0,95**	0,94**	0,92**	-0,52	0,34	0,4	
Campesterol	0,75*	0,76*	0,74	-0,37	0,23	0,34	0,80*

Tableau IV 19 : Valeurs des coefficients de corrélation de Pearson entre les différents composés caractéristiques des chlorophycées au sein de la classe de taille [0,7-5].

* : significatif au seuil 5% ; ** : significatif au seuil 1%.

Finalement, les analyses des contenus en pigments, AG et ST nous ont permis de caractériser les principales composantes de la MOP à l'aide des marqueurs chémotaxonomiques. Le suivi de ces marqueurs chez les différents stades de développement de *Mixodiaptomus laciniatus* devraient nous permettre d'identifier les relations trophiques existant entre ce copépode et ses sources de nourriture potentielles. Par ailleurs, la plupart des AGPI (n-3) et des stérols sont des composés essentiels pour le zooplancton car, soit ils ne peuvent être synthétisés *de novo*, soit ils sont synthétisés en quantités insuffisantes par les copépodes, ceux-ci devant obligatoirement les trouver dans leur nourriture (Sargent & Whittle, 1981 ; Kanazawa, 1984 ; Støttrup & Jensen, 1990 ; Teshima, 1991 ; Teshima et al., 1997). Il sera donc intéressant de visualiser les flux de ces composés dans le réseau trophique et de comprendre leur rôle dans le métabolisme lipidique et le cycle biologique de *Mixodiaptomus laciniatus*.

CHAPITRE V :

MIXODIAPTOMUS LACINIATUS

I. Etude des relations trophiques microorganismes – *M. laciniatus* en conditions expérimentales et en milieu naturel

A. Analyses pigmentaires

1. Expériences de nutrition

a. Objectifs de l'expérience de nutrition

Plusieurs travaux menés tant en milieu naturel qu'en laboratoire et consacrés à l'étude du régime alimentaire des microcrustacés ont souligné l'intérêt des pigments comme traceurs des relations trophiques phytoplancton – zooplancton (Mackas & Bohrer, 1976 ; Dagg & Walser, 1987 ; Kleppel et al., 1988 ; Bautista & Harris, 1992 ; Landry et al., 1994 ; Quiblier et al., 1994 ; Quiblier-Llobéras et al., 1996b ; Descy et al., 1999 ; Bustillos-Guzmán et al., 2002 ; Thys et al., 2003). Toutefois, quelques difficultés méthodologiques ont parallèlement été soulevées. En particulier, certains pigments sont susceptibles d'être transformés et dégradés lors du broutage par le zooplancton. Le taux de dégradation dépend en premier lieu du pigment considéré (Conover et al., 1986 ; Lopez et al., 1988b ; Penry & Frost, 1991 ; Head & Harris, 1992, 1994, 1996 ; Fundel et al., 1998 ; Strom et al., 1998 ; Tirrelli & Mayzaud, 1998 ; Descy et al., 1999 ; Pandolfini et al., 2000), mais aussi de l'espèce zooplanctonique ou du stade de développement impliqués (Head & Harris, 1992 ; Kleppel, 1998 ; Strom et al., 1998 ; Tirrelli & Mayzaud, 1998 ; Pandolfini et al., 2000), de son passé nutritionnel (Penry & Frost, 1991 ; Head & Harris, 1992 ; Mayzaud & Razouls, 1992), du type de nourriture phytoplanctonique et de l'état physiologique de celle-ci (carence en nutriments, sénescence, etc.) (Mayzaud & Razouls, 1992 ; Kleppel, 1998). Ainsi, les premières études dans ce domaine ont suggéré que les caroténoïdes étaient plus stables que les chlorophylles dans le tractus digestif du zooplancton (Kleppel & Pieper, 1984 ; Kleppel et al., 1988, 1991 ; Nelson,

1989). Toutefois, Head & Harris (1992, 1994) et Descy et al. (1999) ont suggéré que certains pigments, par exemple la fucoxanthine des diatomées, étaient dégradés de façon plus importante que les autres caroténoïdes dans le tube digestif des copépodes. A la suite de telles études, il semble donc que certains composés marqueurs soient susceptibles de ne pas être retrouvés en totalité dans les microcrustacés zooplanctoniques.

Les résultats obtenus en milieu naturel sont nécessairement plus complexes dans leur interprétation du fait de l'hétérogénéité des ressources alimentaires, mais aussi parce que l'analyse pigmentaire du zooplancton ne reflète que son passé nutritionnel à très court terme, c'est-à-dire de l'ordre de quelques heures (Bustillos-Guzmán et al., 2002). Il s'avère alors nécessaire de réaliser, parallèlement aux études en milieu naturel, des expériences de nutrition en laboratoire menées en conditions simplifiées avec des proies potentielles présentes dans le milieu naturel. De telles expériences ont pour principaux objectifs de définir l'accessibilité de sources de nourriture potentielles pour l'espèce zooplanctonique considérée, d'estimer ses préférences alimentaires et de faciliter ainsi l'interprétation des résultats obtenus en milieu naturel.

Dans ce contexte et dans le but de préciser le régime alimentaire de *Mixodiaptomus*, nous avons réalisé plusieurs expériences de nutrition avec les différents stades de développement de *M. laciniatus* (N-CI et adultes) et les espèces phytoplanctoniques présentes majoritairement dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut ou des espèces proches de celles-ci en terme de taille et de position taxonomique :

- *Sphaerocystis* sp. (chlorophycée, biovolume : $266\mu\text{m}^3$)
- *Cryptomonas* sp. (cryptophycée, biovolume : $267\mu\text{m}^3$)
- *Synechococcus elongatus* (picocyanobactérie, biovolume : $0,93\mu\text{m}^3$)
- *Cyclotella* sp. (diatomée, biovolume : $335\mu\text{m}^3$)
- *Cosmarium impressulum* (chlorophycée, biovolume : $1996\mu\text{m}^3$)

Les copépodes récoltés en milieu naturel ont subi, avant le déroulement de chacune des expériences, une période de jeûne de deux jours. Après cette phase de jeûne, une partie des copépodes a été analysée en HPLC afin de s'assurer que leur tractus digestif était réellement vide de tout pigment provenant du milieu naturel. Ces analyses ont montré que les copépodes utilisés lors des expériences de nutrition ne présentaient que les pigments connus pour être spécifiques aux microcrustacés (astaxanthine et ses dérivés) et aucun composé d'origine phytoplanctonique.

Les expériences ont tout d'abord été menées avec des apports nutritionnels monospécifiques (microalgues ou cyanobactérie), puis d'autres ont été conduites avec des mélanges de deux espèces phytoplanctoniques. Pour chacune d'elles, les sources de nourriture mono- ou plurispécifiques ont été distribuées à raison de 41µgC/l du milieu d'élevage (chapitre II).

b. Nutrition avec des cultures monospécifiques d'algues ou de picocyanobactéries

Le but principal de cette première approche est de mettre en évidence une éventuelle ingestion de la part de *M. laciniatus* des algues ou cyanobactéries observées dans le milieu naturel. Nous souhaitons également observer le devenir des principaux pigments marqueurs de ces algues dans le tractus digestif du copépode.

La figure V 1 représente, pour chaque expérience, la teneur en chlorophylle *a* (et ses produits de dégradation) et en pigments marqueurs de la source de nourriture dans le milieu d'élevage lors des apports journaliers (en µg/l), ainsi que le contenu intestinal de ces pigments chez les stades N-CI et les adultes de *Mixodiaptomus laciniatus* (en ng/ind.) deux heures après le dernier apport alimentaire (chapitre II).

Les pigments caractéristiques des chlorophycées (*Sphaerocystis* et *Cosmarium*) sont, conformément à la bibliographie, la chlorophylle *b*, la lutéine et la violaxanthine (Hooks et al., 1988 ; Kleppel et al., 1998b). Ces trois composés ont été détectés chez les stades adultes

du copépode, dans des proportions cependant différentes de celles observées chez les algues (Fig. V 1 A, B). Par contre, les stades larvaires (N-CI) ne présentent que de la lutéine et de la chlorophylle *b*. Bien que nous puissions envisager le fait que la violaxanthine ait été dégradée de façon plus importante, nous ne devons pas écarter la possibilité que les teneurs en pigments des stades N-CI soient très faibles et que nous atteignons ici une limite méthodologique liée aux seuils de détection de la chaîne HPLC.

De la même manière, les pigments caractéristiques ou majoritaires des cryptophycées (*Cryptomonas*, Fig. V 1 C) sont l'alloxanthine, la monadoxanthine et la chlorophylle *c*₂ (Wright & Shearer, 1984 ; Gieskes & Kray, 1986). Ces pigments sont également tous retrouvés chez les adultes, alors que les jeunes stades ne présentent que de l'alloxanthine. Pour les composés non identifiés chez ces larves, il est aussi possible qu'ils soient présents en concentrations trop faibles pour être détectés.

Les pigments caractéristiques des diatomées (*Cyclotella*, Fig. V 1 D) sont la fucoxanthine, qui est le composé majoritaire, la diatoxanthine et les chlorophylles *c*₁ et *c*₂ (Wright & Shearer, 1984 ; Quiblier et al., 1994). Le seul pigment détecté dans le zooplancton, quelque soit le stade, est la fucoxanthine.

Enfin, la picocyanobactérie *Synechococcus* présente comme unique pigment marqueur la zéaxanthine (Mantoura & Llewellyn, 1983 ; Millie et al., 1993). Ce composé n'a jamais été détecté chez *Mixodiaptomus*, quelque soit le stade de développement (Fig. V 1 E). Il est possible que ce pigment soit fortement dégradé lors du broutage de la cyanobactérie par le copépode, mais il se peut aussi que celui-ci ne se nourrisse pas sur *Synechococcus* et qu'il l'évite ; cette dernière hypothèse est certainement la plus probable compte tenu que la chlorophylle *a* et ses produits de dégradation, preuves de l'alimentation du copépode sur sa source de nourriture (Quiblier-Llobéras, 1994), n'ont ici jamais été détectés.

En conclusion, mis à part l'expérience réalisée avec *Synechococcus*, la plupart des pigments marqueurs de chaque classe d'algues ainsi que la chlorophylle *a* et ses dérivés ont été détectés chez les différents stades de développement du copépode, ce qui est le signe de l'ingestion de chacune de ces algues par les larves et les adultes. A l'inverse, il semblerait que la picocyanobactérie ne soit pas ingérée par *Mixodiaptomus*, mais il s'avère nécessaire de confirmer ces résultats avec des expériences réalisées avec un mélange de *Synechococcus* et d'autres microalgues. De plus, les composés les mieux représentés chez le zooplancton sont les pigments majoritaires des sources de nourriture ; en effet, nous n'avons pas toujours détecté chez *Mixodiaptomus* les pigments secondaires des microalgues, tels que la violaxanthine chez les deux chlorophycées, la monadoxanthine et la chlorophylle *c*₂ chez la cryptophycée, ou encore la diatoxanthine et les chlorophylles *c*₁ et *c*₂ chez la diatomée. Ceci peut être dû, soit à leur destruction lors du broutage, soit, ce qui est peut être plus probable, à leur présence en concentrations inférieures à la limite de détection de la méthode d'analyse. Enfin, il faut remarquer que chaque type d'algue ou de cyanobactérie présente une concentration pigmentaire différente, malgré le fait que ces sources de nourriture soient toujours distribuées à biomasses équivalentes dans le milieu d'élevage (41µg C/l). En effet, chaque organisme photosynthétique possède sa propre concentration en pigments, ce qui explique les apparentes différences dans les apports au copépode.

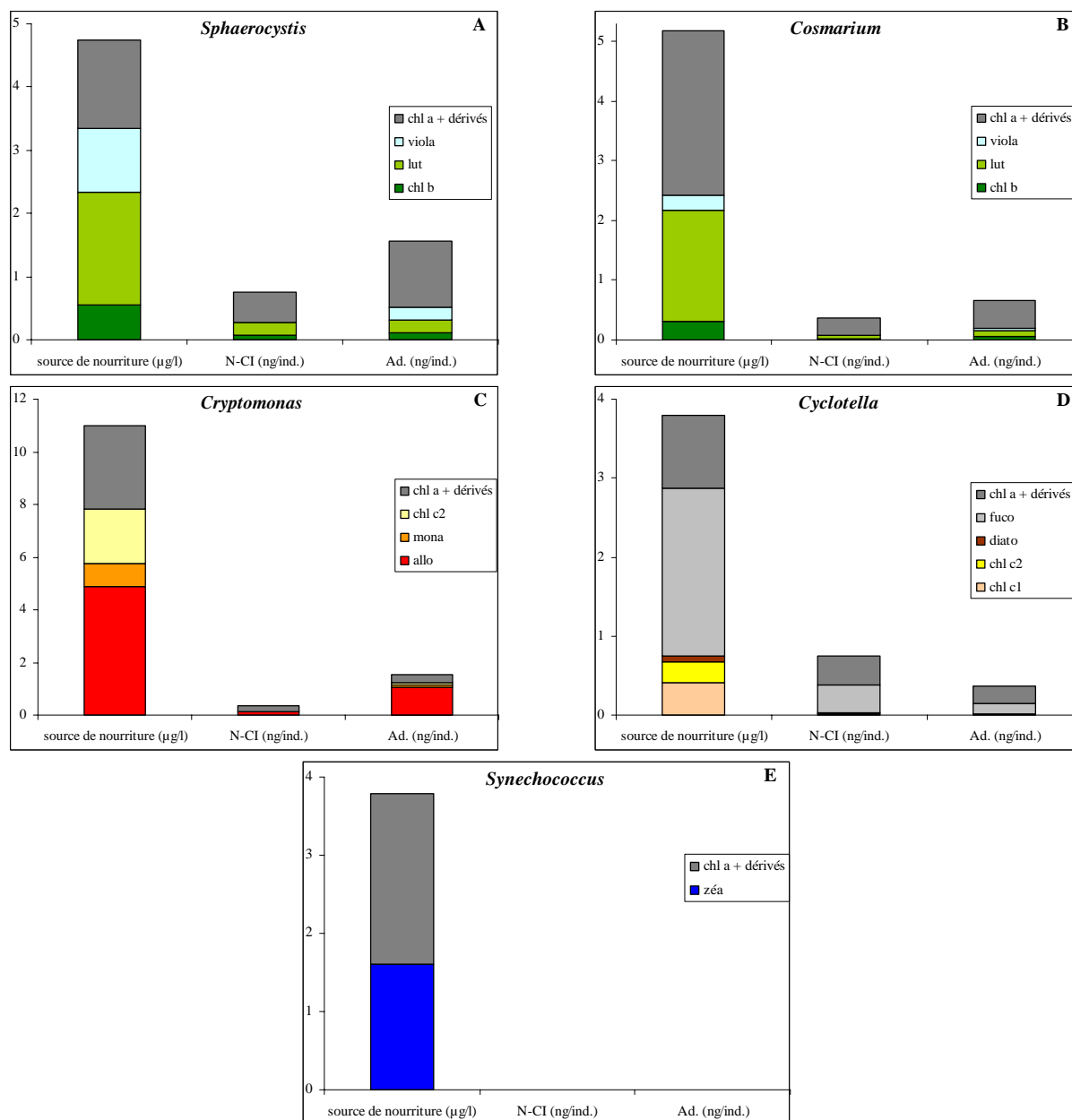


Figure V 1 : Concentrations en chlorophylle a (et ses dérivés) et en pigments marqueurs des différentes sources de nourriture dans le milieu d'élevage (en µg/l de milieu), et contenus intestinaux des stades N-Cl et des adultes (Ad.) de *Mixodiaptomus laciniatus* (en ng/ind.) lors des expériences de nutrition réalisées avec *Sphaerocystis* (A), *Cosmarium* (B), *Cryptomonas* (C), *Cyclotella* (D) et *Synechococcus* (E).

chl a + dérivés = somme des teneurs en chlorophylle a et ses produits de dégradation (chlorophyllide a et phéophytine a).

Pigments marqueurs de *Sphaerocystis* et *Cosmarium* : chl b : chlorophylle b ; lut : lutéine ; viola : violaxanthine.

Pigments marqueurs de *Cryptomonas* : chl c2 : chlorophylle c2 ; allo : alloxanthine ; mona : monadoxanthine.

Pigments marqueurs de *Cyclotella* : chl c1 : chlorophylle c1 ; chl c2 : chlorophylle c2 ; diato : diatoxanthine ; fuco : fucoxanthine.

Pigments marqueurs de *Synechococcus* : zéa : zéaxanthine.

Remarque : Les échelles sont différentes pour chaque expérience de nutrition considérée.

c. Expériences de nutrition réalisées avec un mélange *Synechococcus* – microalgue

La figure V 2 présente la composition pigmentaire, en pourcentage de la concentration totale en pigments marqueurs, des sources de nourriture et des stades N-CI et adultes de *M. laciniatus* lors des expériences de nutrition réalisées avec un mélange de *Synechococcus* et d'une microalgue (Fig. V 1 A : *Sphaerocystis*, B : *Cosmarium*, C : *Cryptomonas*, D : *Cyclotella*). Pour plus de clarté, les proportions de pigments marqueurs de la cyanobactérie sont représentées isolément à celles des pigments marqueurs de la microalgue donnée en mélange au calanoïde.

Lors de chaque expérience, *Synechococcus* et la microalgue ont été distribuées au copépode à raison de 41µg C/l chacune. Cependant, malgré cet apport à biomasses équivalentes, les contenus pigmentaires de chaque cyanobactérie ou microalgue sont différents, ce qui explique que la composition pigmentaire (en pourcentage de la concentration en pigments marqueurs totaux) du mélange de nourriture ne soit pas représentée à 50% par les pigments de *Synechococcus* et à 50% par ceux de la microalgue. De plus, il faut noter que certains composés qui n'avaient pas pu être détectés lors d'un apport monospécifique sont présents en proportions parfois importantes lors des expériences réalisées avec des mélanges de cultures (Fig. V 1). C'est par exemple le cas de la diatoxanthine qui constitue respectivement 51 et 37% des pigments des stades N-CI et Ad. dans l'expérience réalisée avec *Synechococcus* et *Cyclotella*.

Lors de chacune des quatre expériences, la zéaxanthine n'a jamais été détectée dans le zooplancton, quel que soit le stade de développement. Il est dans ce contexte très probable que *Mixodiaptomus laciniatus* n'ingère pas *Synechococcus*.

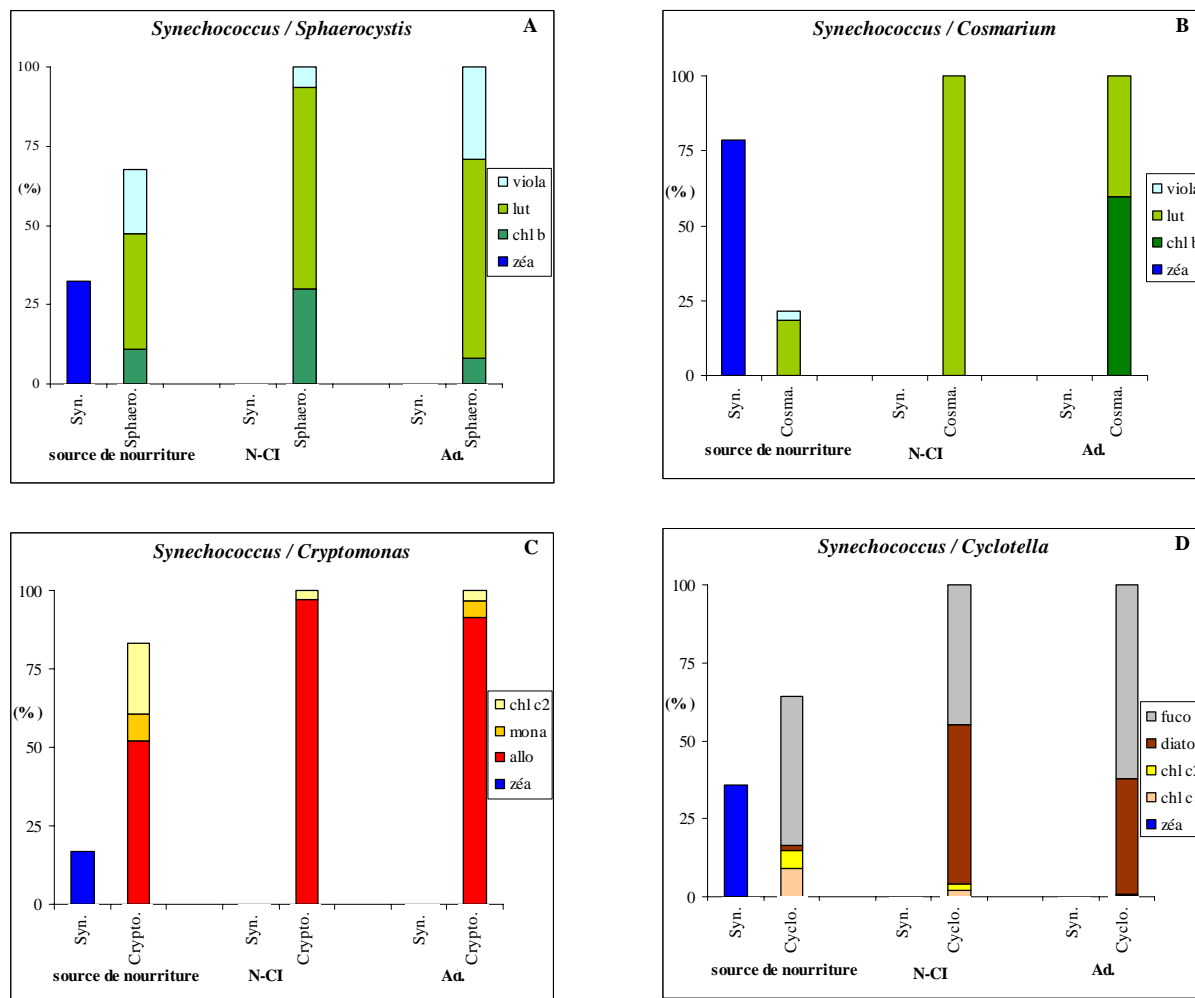


Figure V 2 : Composition relative en pigments marqueurs (en pourcentage de la concentration totale en pigments marqueurs) des différentes sources de nourriture et des stades N-CI et adultes (Ad.) de *Mixodiaptomus laciniatus* lors des expériences de nutrition réalisées avec un mélange de *Synechococcus* et de *Sphaerocystis* (A), *Cosmarium* (B), *Cryptomonas* (C) ou *Cyclotella* (D).

Pigments de *Sphaerocystis* et *Cosmarium* : chl b : chlorophylle b ; lut : lutéine ; viola : violaxanthine.

Pigments de *Cryptomonas* : chl c2 : chlorophylle c2 ; allo : alloxanthine ; mona : monodaxanthine.

Pigments de *Cyclotella* : chl c1 : chlorophylle c1 ; chl c2 : chlorophylle c2 ; diato : diatoxanthine ; fuco : fucoxanthine.

Pigments de *Synechococcus* : zéa : zéaxanthine.

d. Expériences de nutrition réalisées avec un mélange de deux microalgues

La figure V 3 présente les compositions relatives en pigments marqueurs des sources de nourriture et du copépode lors des expériences de nutrition réalisées avec les mélanges suivants : *Cosmarium* et *Cyclotella* (Fig. V 3 A), *Cosmarium* et *Cryptomonas* (Fig. V 3 B), *Sphaerocystis* et *Cyclotella* (Fig. V 3 C), *Sphaerocystis* et *Cryptomonas* (Fig. V 3 D), *Cyclotella* et *Cryptomonas* (Fig. V 3 E). Ces compositions relatives ont été calculées à partir de la teneur en pigments marqueurs totaux dans la source de nourriture et dans le copépode.

Comme nous l'avons précisé précédemment, lors de chaque expérience, chacune des deux microalgues a été distribuée à biomasse équivalente ; cependant, chaque culture d'algue présentant un contenu pigmentaire (quantité de pigments totaux par unité de poids) différent, les proportions de pigments originaires de chacune des deux algues ne sont pas égales dans la source de nourriture distribuée au copépode. Toutefois, ces différences ne semblent pas affecter les résultats obtenus lors de l'analyse de la composition pigmentaire de *Mixodiaptomus*, car celui-ci ne présente pas forcément les mêmes proportions relatives en pigments que sa source de nourriture ; ces différences pourraient être liées à la sélectivité de *M. laciniatus* vis-à-vis de ses sources de nourriture. Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons choisi de calculer un indice de sélectivité d'Ivlev pour chaque source de nourriture lors de chacune des expériences (Tab. V 1). Cet indice, ainsi que les autres indices de sélectivité existant dans la bibliographie, est communément utilisé lors de l'analyse en milieu naturel ou expérimental des relations trophiques phytoplancton – zooplancton à l'aide des pigments marqueurs (Cottonnec et al., 2001 ; Guisande et al., 2002 ; Thys et al., 2003) ; calculé à partir des proportions relatives en pigments marqueurs dans le zooplancton et dans la source de nourriture (voir chapitre II), il propose trois types de comportement du zooplancton vis-à-vis de sa nourriture (filtration sélective sur la classe d'algue considérée, filtration passive, évitement ou rejet).

Lors de l'expérience réalisée avec *Cosmarium* et *Cyclotella* (Fig. V 3 A), les pigments de la source de nourriture sont issus à 45,7% de *Cosmarium* (violaxanthine + lutéine + chlorophylle *b*) et à 54,3% de *Cyclotella* (fucoxanthine + diatoxanthine + chlorophylles *c*₁ et *c*₂). Dans le zooplancton, les pigments marqueurs de la diatomée sont légèrement plus abondants (55,4% chez les N-CI et 63,6% chez les adultes) que ceux provenant de la chlorophycée. En conséquence, les indices d'Ivlev obtenus avec ces valeurs (Tab. V 1) sous-entendent qu'il n'y a pas de préférence alimentaire de la part de chacune des deux écophases du copépode.

Dans l'expérience menée avec *Cosmarium* et *Cryptomonas* (Fig. V 3 B), les pigments de la source de nourriture proviennent à 32,7% de la chlorophycée (violaxanthine + lutéine + chlorophylle *b*) et à 67,3% de la cryptophycée (alloxanthine + monadoxanthine + chlorophylle *c*₂). Pour le zooplancton, les compositions sont différentes selon le stade de développement. Ainsi, les larves présentent 63,6% de pigments provenant de *Cosmarium*, les indices d'Ivlev obtenus dans ce cas (Tab. V 1) suggèrent une sélection de la chlorophycée et un rejet ou un évitement de *Cryptomonas*. Dans le cas des adultes, nous avons observé la tendance inverse, à savoir 76,4% de pigments provenant de *Cryptomonas* et 23,6% issus de la chlorophycée ; les indices d'Ivlev proches de 0 quelle que soit la source de nourriture laissent penser à une absence de sélection vis-à-vis de l'une ou l'autre des algues (Tab. V 1).

Lors de l'expérience réalisée avec *Sphaerocystis* et *Cyclotella* (Fig. V 3 C), la nourriture distribuée contient 57,6% de pigments marqueurs de la chlorophycée (violaxanthine + lutéine + chlorophylle *b*) et 42,4% de pigments caractéristiques de la diatomée (fucoxanthine + diatoxanthine + chlorophylles *c*₁ et *c*₂). Ici encore, il faut différencier les adultes des larves. La composition pigmentaire des adultes ne diffère que très peu de celle de la source de nourriture, et par conséquent les indices d'Ivlev obtenus (Tab. V 1) nous suggèrent qu'il n'y a pas de sélection. Pour les stades larvaires, la composition pigmentaire est représentée par

77,3% de marqueurs de *Sphaerocystis* et 22,7% de marqueurs de la diatomée ; les indices de sélectivité obtenus dans ce cas (Tab. V 1) nous laissent penser que *Sphaerocystis* serait ingérée de façon passive mais que *Cyclotella*, lorsqu'elle est mélangée à cette algue, est rejetée par les larves du copépode.

Lors de l'expérience réalisée avec *Sphaerocystis* et *Cryptomonas* en mélange (Fig. V 3 D), les compositions pigmentaires de la source de nourriture ainsi que celles des N-CI et des adultes de *Mixodiaptomus* sont très proches. En effet, les proportions de pigments marqueurs de la chlorophycée sont de 48,5, 68,5 et 51,2% respectivement dans la nourriture, les stades N-CI et les adultes. Les indices d'Ivlev obtenus pour cette expérience (Tab. V 1) montrent l'absence de sélection vis-à-vis de l'une ou l'autre des algues et une filtration passive de celles-ci par les deux écophases du copépode.

Lors de l'expérience menée avec *Cyclotella* et *Cryptomonas* (Fig. V 3 E), la source de nourriture comprend 94,1% de pigments originaires de la diatomée (fucoxanthine + diatoxanthine + chlorophylle c_1). Ici, la chlorophylle c_2 n'a pas été prise en compte car elle est partagée par les deux algues. Les larves ne contiennent aucun pigment de *Cyclotella*, l'indice de sélectivité (Tab. V 1) suggérant alors le rejet de celle-ci et une forte sélectivité vis-à-vis de la cryptophycée. La tendance est la même pour les adultes, malgré la présence de 44,2% de pigments provenant de *Cyclotella*.

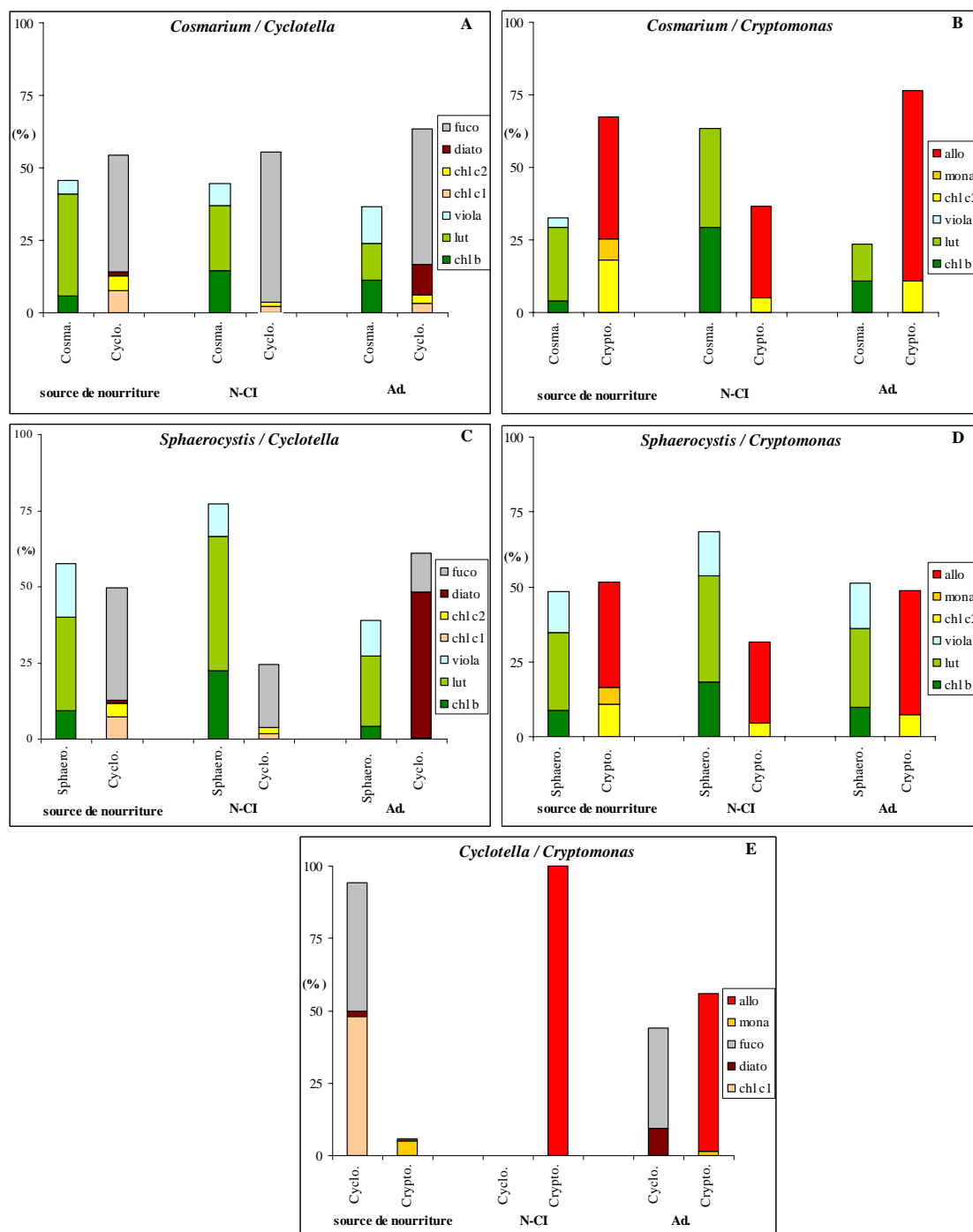


Figure V 3 : Composition relative en pigments marqueurs (en pourcentage de la concentration totale en pigments marqueurs) des différentes sources de nourriture et des stades N-CI et adultes (Ad.) de *Mixodiaptomus laciniatus* lors des expériences de nutrition réalisées avec les mélanges Cosmarium/Cyclotella (A), Cosmarium/Cryptomonas (B), Sphaerocystis/Cyclotella (C), Sphaerocystis/Cryptomonas (D) et Cyclotella/Cryptomonas (E). Pigments de Sphaerocystis et Cosmarium : chl b : chlorophylle b ; lut : lutéine ; viola : violaxanthine. Pigments de Cryptomonas : chl c2 : chlorophylle c2 ; allo : alloxanthine ; mona : monadoxanthine. Pigments de Cyclotella : chl c1 : chlorophylle c1 ; chl c2 : chlorophylle c2 ; diato : diatoxanthine ; fuco : fucoxanthine.

Mélanges de nourriture	Algue considérée	Indices d'Ivlev			
		N-CI		Adultes	
Cosmarium / Cyclotella	Cosmarium	-0,01	*	-0,11	*
	Cyclotella	+0,01	*	+0,08	*
Cosmarium / Cryptomonas	Cosmarium	+0,32	**	-0,16	*
	Cryptomonas	-0,30	~	+0,06	*
Sphaerocystis / Cyclotella	Sphaerocystis	+0,15	*	-0,19	*
	Cyclotella	-0,30	~	+0,18	*
Sphaerocystis / Cryptomonas	Sphaerocystis	+0,17	*	+0,03	*
	Cryptomonas	-0,24	*	-0,03	*
Cyclotella / Cryptomonas	Cyclotella	-1,00	~	-0,36	~
	Cryptomonas	+0,89	**	+0,81	**

Tableau V 1 : Valeurs des indices d'Ivlev obtenus lors des expériences de nutrition réalisées avec des mélanges de microalgues deux à deux pour les stades N-CI et adultes de *Mixodiaptomus laciniatus*.

Indices d'Ivlev (E, voir chapitre II) : ** : filtration sélective sur l'algue considérée ($E > +0,25$) ;

* : filtration passive sur l'algue considérée ($+0,25 > E > -0,25$) ;

~ : évitement ou rejet de l'algue considérée ($E < -0,25$).

e. Conclusion

L'une des principales critiques de l'analyse pigmentaire du tractus digestif pour estimer la nutrition du zooplancton est basée sur l'apparente variabilité du taux de destruction des pigments lors du broutage (Penry & Frost, 1990, 1991). Ainsi, Head & Harris (1992, 1994) et Descy et al. (1999) ont observé que certains caroténoïdes étaient plus stables que d'autres. Quelques suggestions ont été faites pour expliquer cette forte variabilité. Par exemple, Head (1988, 1992) propose que le taux de destruction des pigments est lié aux conditions nutritives (taux d'ingestion, conditions de température ou de lumière du milieu, concentration et composition taxonomique de la source de nourriture, etc.) auxquelles les animaux collectés en milieu naturel avaient été soumis précédemment. Penry & Frost (1991) considèrent aussi les effets d'acclimatation. De la même manière, Head (1992) montre que les copépodes ont des contenus pigmentaires supérieurs lorsqu'ils ont été mis à jeûner avant l'expérience de nutrition ; le temps de jeûne nécessaire dépend de l'espèce de copépode considérée, il est généralement compris entre 1 et 24 heures (Head, 1992 ; Bustillos-Guzmán et al., 2002). Après avoir testé plusieurs temps de jeûne et avoir réalisé des analyses en HPLC, nous avons choisi de faire jeûner *Mixodiaptomus* pendant deux jours afin d'être sûr que son tractus digestif était réellement vide de tout pigment d'origine phytoplanctonique.

Lors de notre étude, nous avons observé une bonne concordance entre la composition pigmentaire de la source de nourriture et celle du copépode. Toutefois, certains pigments minoritaires chez les algues ont montré une forte variabilité dans le zooplancton car ceux-ci n'ont pas toujours été détectés chez le copépode. C'est le cas par exemple de la violaxanthine absente du zooplancton lors de l'expérience menée avec *Sphaerocystis* seule, et présente en proportions non négligeables lors des expériences menées avec un mélange de *Sphaerocystis* et d'autres algues. Ce problème est probablement lié à la présence de ce composé dans le zooplancton mais à une teneur inférieure à la limite de détection. Malgré cette importante

variabilité au niveau des pigments minoritaires des sources de nourriture, on retrouve tout de même au niveau du zooplancton les pigments majoritaires de chaque type d'algue. Lors de l'analyse pigmentaire des copépodes prélevés en milieu naturel, la détection de ces pigments majoritaires, généralement utilisés en tant que marqueurs lors de l'étude des relations trophiques phytoplancton – zooplancton, pourra donc nous fournir une bonne indication des algues phytoplanctoniques effectivement ingérées par *Mixodiaptomus laciniatus*.

Ces expériences ont également montré que toutes les algues majoritaires de la MOP du lac de La Godivelle-d'en-Haut sont ingérées par les stades larvaires et adultes du copépode. Seule la picocyanobactérie *Synechococcus*, composante pourtant très importante de la biomasse microbienne du lac (chapitre IV), ne semble pas être ingérée, quelque soit le stade de développement du copépode considéré. Irigoien et al. (2000) aboutissent à la même conclusion chez *Calanus helgolandicus* et supposent que l'absence de nutrition sur les picocyanobactéries serait due à une sélection des copépodes en fonction de la taille des cellules phytoplanctoniques ; en effet, on considère généralement que les cellules de petite taille (inférieure à 5µm) ne sont pas capturées efficacement par les copépodes (Conover et al., 1986 ; Berggreen et al., 1988 ; Paffenhöfer, 1988 ; Hansen & Boeckel, 1991 ; Kleppel et al., 1998b). Toutefois des études plus récentes ont montré qu'il pouvait y avoir ingestion de cellules picoplanctoniques par certaines espèces de copépodes (Calbet et al., 2000). En milieu naturel (lac de La Godivelle-d'en-Haut) et lors de notre expérimentation, la picocyanobactérie *Synechococcus* est toujours sous forme de cellules isolées ayant un diamètre inférieur à 2µm, taille qui pourrait expliquer son évitement par *Mixodiaptomus*.

De plus, la chlorophycée *Sphaerocystis*, composante également très importante en terme de biomasse microbienne dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, en particulier en automne (chapitre IV), est une algue coloniale formée de cellules de petite taille (9,4 x 7,4 µm) entourées d'une gangue mucilagineuse. Nous avons donc des doutes quant à l'ingestion de ces

colonies par *M. laciniatus*. En effet, la nutrition des copépodes sur les algues vertes semble dépendre de l'espèce phytoplanctonique considérée, certains travaux en rapportant l'évitement (Johnson et al., 1982 ; Meyer-Harms et al., 1999), alors que d'autres études suggèrent la sélection de ces algues par d'autres espèces de calanoïdes (DeMott, 1995 ; DeMott & Müller-Navarra, 1997 ; Koski et al., 1998).

Lors de notre étude, les expériences menées avec des mélanges d'algues montrent que chaque stade de développement du calanoïde a ses propres préférences alimentaires. Ainsi, les stades larvaires (N-CI) semblent sélectionner, par ordre de préférence, *Cosmarium*, puis *Sphaerocystis* et *Cryptomonas*, et enfin *Cyclotella*. Concernant les adultes, ceux-ci semblent préférer *Cryptomonas* puis *Cyclotella*, les deux chlorophycées (*Sphaerocystis* et *Cosmarium*) étant ingérées de façon passive lorsqu'elles sont distribuées en mélange avec d'autres algues. De la même manière, Quiblier-Llobéras et al. (1996a) ont observé chez le calanoïde lacustre *Acanthodiaptomus denticornis* que les adultes et les copépodites n'avaient pas le même comportement alimentaire et exerçaient une sélectivité différente selon le type de microalgue considéré. Dans ce contexte, il est intéressant de se demander quels sont les mécanismes gérant ces préférences alimentaires différentes selon le type d'algue et le stade de développement du copépode. De nombreuses études relatives à la nutrition des copépodes adultes ont suggéré que ceux-ci sélectionnaient, dans un mélange de plusieurs types de cellules phytoplanctoniques, les algues de plus grande taille et ingéraient passivement les autres (DeMott & Watson, 1991). Mis à part *Cosmarium*, dont le biovolume cellulaire moyen est de $1996\mu\text{m}^3$, les autres algues ont des tailles équivalentes (biovolumes cellulaires compris entre 266 et $335\mu\text{m}^3$), la sélection des particules en fonction de leur taille ne pouvant donc pas s'expliquer pour ces espèces. Le même phénomène a été observé chez *Calanus*, chez qui certaines algues sont préférées à d'autres de même taille et à concentration identique (Huntley et al., 1986) : c'est par exemple le cas de *Cryptomonas* qui est activement consommé par ce

copépode (Head & Harris, 1996). D'autres facteurs doivent alors être pris en compte, tels que la mobilité ou la forme des cellules. *Cryptomonas* étant la seule algue flagellée au cours de nos expériences, sa mobilité pourrait probablement expliquer la préférence des adultes de *Mixodiaptomus* vis-à-vis de celle-ci. Cependant, au vu de nos expériences de nutrition, nous ne pouvons que supposer que la mobilité des microalgues est attractive pour le copépode ; il serait cependant nécessaire de confirmer cette hypothèse en proposant d'autres microalgues flagellées aux copépodes.

Concernant les stades larvaires, très peu d'études ont été consacrées aux mécanismes de nutrition et de sélectivité des particules (Cyr, 1997 ; Irigoien et al., 2000). Cependant, il semble que les nauplii ingèrent essentiellement des particules inférieures à 30µm de diamètre (Infante, 1981 ; Zánkai, 1991), et que les taux de broutage des algues comprises entre 12 et 30µm de diamètre sont supérieurs à ceux des particules de moins 10µm (Bogdan & Gilbet, 1987). De la même manière que pour les adultes, il semble là aussi que d'autres facteurs que la taille des particules doivent être pris en compte, tels que la mobilité et la forme des cellules (Fernandez, 1979). Cependant, comme pour les adultes, notre étude ne nous permet pas de préciser réellement les mécanismes mis en jeu.

2. Etude en milieu naturel

a. Contenu digestif en pigments marqueurs des adultes de la première génération

Le tableau V 2 représente la composition relative en pigments marqueurs des adultes reproducteurs et des différentes classes de taille de la MOP correspondante (en pourcentage des teneurs en pigments marqueurs totaux détectés dans le zooplancton). Les seuls pigments marqueurs observés chez les copépodes sont la chlorophylle *b* et la lutéine qui sont caractéristiques des chlorophycées, l'alloxanthine marqueur des cryptophycées, et la chlorophylle *c₁* marqueur des diatomées. Il faut noter que, pour chacune des dates

d'échantillonnage considérée, les pigments présents chez le copépode étaient simultanément détectés dans la MOP. De plus, ces composés n'ont été observés chez les adultes qu'à trois dates d'échantillonnage, en mai, juin et juillet. La chlorophylle *b* et la lutéine sont les pigments marqueurs majoritaires dans le zooplancton, ils constituent entre 73,4 et 98,2% de l'ensemble des pigments marqueurs détectés chez les adultes.

Pour les dates d'échantillonnage où ont été détectés ces composés, nous avons calculé des indices d'Ivlev (chapitre II) en comparant les proportions relatives de chacun de ces pigments dans les différentes classes de la MOP et chez les adultes de *M. laciniatus* (Tab. V 2). Ainsi, les chlorophycées semblent être préférentiellement ingérées par les copépodes en juin et juillet, en particulier celles présentes dans les classes de taille [30-100] et [0,7-5], alors qu'elles constituent une faible proportion de la biomasse microbienne totale à ces dates (chlorophycées picoplanctoniques : 13,9 et 11,4% de la biomasse microbienne totale respectivement en juin et juillet ; autres chlorophycées : 2,9 et 5,9% de la biomasse microbienne totale en juin et juillet). De plus, les adultes présentent des quantités non négligeables de chlorophylle *c₁* en juin et juillet et d'alloxanthine en juillet, signes de l'ingestion de diatomées et de cryptophycées dont les pigments marqueurs n'ont été détectés que dans la fraction [30-100] de la MOP. Etant donné les fortes proportions relatives de ces composés dans la MOP comparativement à celles observées dans le zooplancton, les indices d'Ivlev calculés pour ces pigments suggèrent un rejet de ces algues. Toutefois, il faut noter que les indices d'Ivlev sont calculés en considérant uniquement les pigments détectés dans le zooplancton (Cottonnec et al., 2001), les proportions réelles de ces composés dans la MOP sont par conséquent beaucoup plus faibles (chapitre IV, Fig. IV 10). Ces indices d'Ivlev doivent donc être considérés avec précaution. En fait, les cryptophycées constituent respectivement 13 et 6,4% de la biomasse microbienne totale en juin et juillet, et les proportions d'alloxanthine dans la classe de taille [30-100] (en pourcentage des pigments

marqueurs totaux) sont de 9,1% en juin et de 2,8% en juillet (chapitre IV) ; les diatomées constituent 0,1% de la biomasse microbienne totale en juillet, et la chlorophylle c_1 représentant 4,3% des pigments marqueurs dans la classe de taille [30-100] (chapitre IV). La présence de ces deux composés chez les adultes du copépode suggère dans ce contexte une sélection importante vis-à-vis de ces deux classes d'algues.

		déc.-01	mars-02	avr.-02	mai-02	juin-02	juil.-02
chl b (chlorophycées)	[30-100]	44,7	18,2	27,4	ND	20,8 **	32,1 *
	[5-30]	29,4	29,1	57,2	ND	23,3 *	16,9 *
	[0,7-5]	-	13,4	30,4	ND	19,0 **	11,7 **
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	-	36,5 ± 18,1	34,8 ± 25,3	20,3 ± 24,5
lut (chlorophycées)	[30-100]	36,8	38,9	55,7	ND	35,1 **	55,7 *
	[5-30]	57,3	44,3	25,1	ND	41,2 *	83,1 *
	[0,7-5]	100,0	84,6	61,1	ND	71,2 *	88,3 *
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	-	36,9 ± 10,3	62,4 ± 29,2	77,9 ± 26,2
allo (cryptophycées)	[30-100]	6,3	9,7	7,1	ND	21,4 ~	4,8 ~
	[5-30]	-	-	-	ND	-	-
	[0,7-5]	-	-	-	ND	-	-
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	-	-	2,7 ± 3,9	1,1 ± 2,0
chl c1 (diatomées)	[30-100]	12,2	33,2	9,8	ND	22,7	7,4 ~
	[5-30]	13,3	26,6	17,7	ND	35,5	-
	[0,7-5]	-	2,0	8,5	ND	9,7	-
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	-	26,6 ± 8,9	-	0,7 ± 1,1

Tableau V 2 : Indices d'Ivlev et composition relative en pigments marqueurs des adultes de la première génération de *M. laciniatus* et des différentes classes de taille de la MOP correspondantes. Les données sont exprimées en pourcentages des teneurs en pigments marqueurs totaux observés dans le zooplancton (moyennes ± écart-types).

chl b : chlorophylle b ; lut : lutéine ; allo : alloxanthine ; chl c1 : chlorophylle c1 ;

ND : données manquantes ;

- : concentrations inférieures à la limite de détection ;

Indices d'Ivlev (E) : ** : filtration sélective sur la classe d'algue considérée ($E > +0,25$) ; * : filtration passive sur la classe d'algue considérée ($+0,25 > E > -0,25$) ; ~ : évitement ou rejet de la classe d'algue considérée ($E < -0,25$).

b. Contenu digestif en pigments marqueurs des copépodes de la deuxième génération

La composition relative en pigments marqueurs des copépodes de la deuxième génération au cours de leur développement larvaire ainsi que celle des différentes classes de taille de la MOP correspondante sont données dans le tableau V 3. De la même manière que pour les adultes de la première génération (Tab. V 2), les seuls pigments marqueurs détectés chez cette génération sont la chlorophylle *b*, la lutéine, l'alloxanthine et la chlorophylle *c₁* ; la lutéine et la chlorophylle *b* sont les pigments majoritaires, constituant ensemble entre 41,4 et 100% des pigments marqueurs. Les indices d'Ivlev obtenus pour ces deux composés montrent que les chlorophycées constituent une part importante des algues phytoplanctoniques ingérées par les larves.

L'alloxanthine, pigment marqueur des cryptophycées, n'a été détectée qu'en novembre, date à laquelle ce groupe phytoplanctonique représente 0,6% de la biomasse microbienne totale ; l'indice de sélectivité obtenu suggère alors qu'il y a une forte sélection du copépode vis-à-vis de ces algues à cette date d'échantillonnage.

Concernant l'ingestion de diatomées, caractérisée par la présence de chlorophylle *c₁* chez *Mixodiaptomus*, celle-ci peut, à certaines dates, être très importante, comme c'est le cas en juin où ces algues constituent 1,1% de la biomasse microbienne totale alors que la chlorophylle *c₁* représente 58,6% des pigments détectés chez les calanoïdes.

		avr.-02 NI	mai-02 NII-NIII	juin-02 CI-CII	juil.-02 CIII-CIV	sept.-02 CV-Ad.	nov.-02 CV-Ad.
chl <i>b</i> (chlorophycées)	[30-100]	27,4	ND	20,8 **	32,1 ~	35,2	57,4 ~
	[5-30]	57,2	ND	23,3 **	16,9 ~	52,8	47,6 *
	[0,7-5]	30,4	ND	19,0 **	11,7 ~	52,4	17,2 **
	<i>M. laciniatus</i>	-	14,8	41,4 ± 49,8	3,9 ± 5,5	-	32,0 ± 28,8
lut (chlorophycées)	[30-100]	55,7	ND	35,1 ~	55,7 *	62,4	41,4 *
	[5-30]	25,1	ND	41,2 ~	83,1 ~	41,8	49,0 *
	[0,7-5]	61,1	ND	71,2 ~	88,3 ~	31,0	54,6 *
	<i>M. laciniatus</i>	-	85,2	-	44,3 ± 62,6	-	59,6 ± 40,6
allo (cryptophycées)	[30-100]	7,1	ND	21,4 ~	4,8 ~	2,4	-
	[5-30]	-	ND	-	-	5,5	3,4 **
	[0,7-5]	-	ND	-	-	16,6	28,3 ~
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	-	-	-	8,3 ± 11,8
chl <i>c1</i> (diatomées)	[30-100]	9,8	ND	22,7 **	7,4 ~	-	1,2
	[5-30]	17,7	ND	35,5 **	-	-	-
	[0,7-5]	8,5	ND	9,7 **	-	-	-
	<i>M. laciniatus</i>	-	-	58,6 ± 49,8	1,8 ± 2,6	-	-

Tableau V 3 : Indices d'Ivlev et composition relative en pigments marqueurs de la deuxième génération de *M. laciniatus* et des différentes classes de taille de la MOP correspondantes. Les données sont exprimées en pourcentages des teneurs en pigments marqueurs totaux observés dans le zooplancton (moyennes ± écart-types).

chl *b* : chlorophylle *b* ; lut : lutéine ; allo : alloxanthine ; chl *c1* : chlorophylle *c1* ;

ND : données manquantes ;

- : concentrations inférieures à la limite de détection ;

Indices d'Ivlev (E) : ** : filtration sélective sur la classe d'algue considérée ($E > +0,25$) ; * : filtration passive sur la classe d'algue considérée ($+0,25 > E > -0,25$) ; ~ : évitement ou rejet de la classe d'algue considérée ($E < -0,25$).

3. Conclusion

L'analyse des contenus pigmentaires de *M. laciniatus* prélevé dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut nous renseigne sur son comportement alimentaire vis-à-vis des différents groupes phytoplanctoniques présents dans le milieu, mais elle soulève un certain nombre de questions qu'il est nécessaire d'évoquer dans un premier temps. En effet, les pigments marqueurs ne sont pas toujours détectés chez *Mixodiaptomus*, en particulier chez les adultes ; de plus, aux dates où les pigments marqueurs ont pu être identifiés dans le zooplancton, certains réplicats des échantillons de zooplancton ne contenaient pas ou très peu de pigments, ce qui explique les écart-types parfois très importants relevés chez le calanoïde. L'absence de détection peut être due à plusieurs causes possibles :

Tout d'abord, comme nous l'avons largement souligné avec les expériences de nutrition, les pigments peuvent être détruits de façon très variable lors de leur passage dans le tractus digestif des copépodes ; ce phénomène pourrait expliquer pourquoi il n'existe pas toujours de concordance entre les variations des proportions de chlorophylle *b* et celles de lutéine dans le zooplancton, alors que ces composés sont tous deux marqueurs des chlorophycées et devraient par conséquent évoluer de la même manière. Par exemple, chez les larves récoltées dans le lac en juin (Tab. V 3), les indices d'Ivlev obtenus à partir de la chlorophylle *b* suggèrent une sélection des chlorophycées, alors que ceux calculés à partir de la lutéine suggèrent l'évitement ou le rejet de ces algues.

Ensuite, le contenu pigmentaire du zooplancton nous renseigne sur le passé nutritionnel à très court terme de l'organisme étudié, c'est-à-dire de l'ordre de quelques heures (Bustillos-Gusmán et al., 2002). De nombreuses études ont été consacrées aux variations nycthémérales de l'activité nutritive des copépodes ; celles-ci montrent qu'il existe une relation entre la nutrition et l'intensité lumineuse, l'activité nutritive étant supérieure pendant la nuit (Marshall, 1924 ; Fuller, 1937 ; Wimpenny, 1938). Enfin, des travaux plus récents utilisant l'analyse des

contenus pigmentaires du tractus digestif ou celle des enzymes ont confirmé une nutrition nocturne à certaines périodes de l'année et sous des conditions particulières (Harris & Malej, 1986 ; Huntley et al., 1987 ; Morales et al., 1993 ; Quiblier-Llobéras, 1994).

Enfin, les biomasses des organismes microbiens autotrophes de la MOP [0,7-100] relevées dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut sont très faibles de décembre à juillet (entre 47,3 et 208,6 µg C/l), puis elles atteignent 810,8 et 1207,5 µg C/l respectivement en septembre et novembre (chapitre IV). Lors de cette étude en milieu naturel, il faut donc considérer les biomasses très faibles de la MOP, d'autant qu'il est probable que *Mixodiaptomus* ne soit pas capable de se nourrir sur toute la gamme de taille des particules constituant la MOP [0,7-100]. En effet, lors de l'expérience de nutrition, la nourriture était distribuée chaque jour à raison de 41 µg C/l ; étant donné que la gamme de taille de ces particules distribuées lors des expériences de nutrition, mis à part peut être *Synechococcus*, leur permettait d'être ingérées par *Mixodiaptomus*, la ration alimentaire mise à disposition du calanoïde chaque jour est par conséquent relativement importante par rapport aux biomasses phytoplanctoniques de la MOP totale [0,7-100] observées dans le lac. Ces faibles biomasses phytoplanctoniques ainsi que le comportement alimentaire du copépode probablement variable selon la période de la journée et les saisons pourraient donc expliquer pourquoi les contenus pigmentaires de *M. laciniatus* prélevé en milieu naturel sont largement plus faibles que ceux des copépodes nourris en laboratoire (Tab. V 4). Il faut également noter que les contenus pigmentaires que nous avons relevés chez *Mixodiaptomus laciniatus* sont du même ordre de grandeur que ceux observés chez le calanoïde lacustre *Acanthodiaptomus denticornis* par Quiblier-Llobéras (1994).

Contenu en pigments totaux d'origine phytoplanctonique (pg/ind.)	N-CIV		CV-Ad.	
	Expérience de nutrition	Etude en milieu naturel	Expérience de nutrition	Etude en milieu naturel
Minimum	70	0	126	0
Maximum	1849	226	5970	106

Tableau V 4 : Comparaison des contenus en pigments phytoplanctoniques totaux (en pg/ind.) (pigments propres au zooplancton, tels que l'astaxanthine et ses dérivés, non compris ; chlorophylle *a* et ses produits de dégradation pris en compte) obtenus pour les larves et les stades âgés de *Mixodiaptomus laciniatus* lors des expériences de nutrition et lors de l'étude en milieu naturel.

L'ensemble de ces difficultés est lié à l'utilisation des pigments pour étudier les relations trophiques phytoplancton – zooplancton. L'analyse en parallèle des compositions en AG et en ST du zooplancton, composés généralement considérés comme relatifs au passé nutritionnel à plus long terme du zooplancton, fournit une autre batterie d'indicateurs pour décrire les relations existant entre les différents stades de développement du copépode et les composantes de la MOP.

Malgré cela, ces analyses des contenus digestifs en pigments de *Mixodiaptomus* ont été d'un grand intérêt pour comprendre le régime alimentaire et le comportement de ce crustacé vis-à-vis des organismes phytoplanctoniques du milieu. En effet, lors de l'étude menée dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, nous avons retrouvé les pigments marqueurs des chlorophycées, des cryptophycées et des diatomées chez les différents stades du copépode. Les chlorophycées étant l'une des principales composantes de la MOP du lac, il est normal de les retrouver dans le tractus digestif de *Mixodiaptomus*. Par contre, nous avons vu précédemment que les diatomées, mais également les cryptophycées (chapitre IV), n'étaient présentes qu'à des biomasses parfois très faibles dans le milieu. Il est probable que ces algues soient par conséquent fortement sélectionnées par les larves et les adultes du copépode. Cette

tendance a également été mise en évidence lors des expériences de nutrition menées en laboratoire.

Enfin, la zéaxanthine, pigment marqueur des cyanobactéries, n'a jamais été détectée, ni en milieu naturel, ni lors des expériences menées en laboratoire. De plus, l'absence de chlorophylle *a* et de ses produits de dégradation lors des expériences menées avec *Synechococcus* suggèrent l'absence d'ingestion de cette picocyanobactérie par le copépode en laboratoire. Malgré les biomasses très importantes de ces cellules rencontrées dans le lac pendant toute la période d'étude (chapitre IV), celles-ci ne semblent donc pas constituer une source de nourriture pour *Mixodiaptomus*.

B. Acides gras

L'utilisation des acides gras en tant que biomarqueurs des relations trophiques biomasse microbienne – *Mixodiaptomus laciniatus* concernera ici la deuxième génération, c'est-à-dire celle dont le développement larvaire se déroule du printemps 2002 (NI d'avril) à l'automne 2002 (CV-Ad. de novembre). Nous analyserons les compositions en AG de l'ensemble des tri-, mono- et diglycérides (nommés ici glycérides ou GL pour plus de clarté), celles des cérides (CE), puis celles des phospholipides (PL).

1. Composition en AG des GL extraits de *Mixodiaptomus laciniatus* de la deuxième génération

La composition en AG des GL extraits de la deuxième génération de *M. laciniatus* (Tab. V 5) montre d'importantes variations pendant la période d'étude ; ainsi est-il possible de considérer deux phases distinctes dans les compositions en AG, la première d'avril à juillet, qui correspond aux stades NI à CIII-CIV, et la deuxième de septembre à novembre correspondant aux stades CV-Ad.. La même tendance est observée pour les teneurs en AGT

des GL; en effet, celles-ci sont comprises entre 0,49 (mai) et 4,27 ng/ind. (juillet) chez les jeunes stades, puis elles s'accroissent fortement chez les stades CV-Ad. des deux sexes (teneurs comprises entre 13,28 et 27,84 ng/ind.).

Concernant les jeunes stades (NI à CIII-CIV), la composition en AG est principalement constituée d'AGS qui représentent entre 66,9 (mai) et 80,9% (avril) des AG totaux (AGT), et dont le composé majoritaire est le 16:0 ; ses teneurs varient entre 34,7 (juillet) et 42,7% des AGT (avril). Les AGMI constituent généralement une faible proportion des AGT (entre 4,7% en avril et 10,6% en mai), le 18:1(n-9) étant l'AGMI majoritaire. Les AGPI constituent entre 9,5 (juillet) et 18,8% (mai) des AGT ; ils sont principalement formés d'AGPI de la série (n-3) dont les proportions varient entre 3,6 (juillet) et 9,8% (mai) des AGT. Les principaux AGPI durant cette période sont les AGPI à 16 atomes de carbone (entre 1,8 et 2,7% des AGT), le 18:3(n-3) (1,1 à 3,2% des AGT) et le 22:6(n-3) (entre 0,5 et 3,4%).

A partir du mois de septembre, lorsque les individus de la seconde génération atteignent les stades CV à adultes, les compositions en AG des mâles et des femelles de *Mixodiaptomus* sont caractérisées par de fortes proportions d'AGS, comprises entre 38,0 (mâles de novembre) et 55,3% (femelles de septembre) des AGT ; ces AGS sont représentés par de fortes proportions en 16:0 (9,9 à 21,4% des AGT) et en AGR (7,9 à 10,4% des AGT). Les pourcentages d'AGMI varient entre 15,6 (femelles de septembre) et 21,2% (mâles de novembre) des AGT, l'AGMI principal étant le 18:1(n-9) dont les proportions sont comprises entre 9,6 (femelles de novembre) et 12,4% (mâles de septembre) des AGT. Les AGPI constituent entre 21,8 (femelles de septembre) et 38,1% (mâles de novembre) des AGT, ce qui est considérable par rapport aux jeunes stades. Parmi ces AGPI, ce sont ceux de la série (n-3) qui montrent les valeurs les plus fortes (entre 12,2% chez les femelles de septembre et 23,2% chez les mâles de novembre). Les principaux AGPI sont le 18:3(n-3) (entre 5,5 et 8,7%

	avr.-02 NI	mai-02 NI-II-III	juin-02 CI-II	juil.-02 CIII-IV	sept.-02		nov.-02	
					CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂	CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂
14-0	13,36 ± 1,64	9,15 ± 0,79	12,35 ± 1,33	24,54 ± 2,88	16,53 ± 2,70	14,03 ± 0,80	13,77 ± 2,04	11,29 ± 3,39
15-0	5,03 ± 0,14	2,35 ± 0,97	2,92 ± 1,41	2,67 ± 0,27	3,14 ± 0,51	2,74 ± 0,04	3,24 ± 0,46	3,28 ± 0,31
16-0	42,70 ± 0,36	34,69 ± 2,35	38,76 ± 5,90	34,67 ± 3,13	21,40 ± 3,97	21,21 ± 0,48	21,25 ± 2,46	9,91 ± 13,05
17-0	2,17 ± 0,03	1,78 ± 0,36	0,92 ± 0,15	1,07 ± 0,09	0,99 ± 0,14	1,08 ± 0,01	1,14 ± 0,07	0,98 ± 0,14
18-0	7,35 ± 0,48	9,54 ± 0,87	6,91 ± 1,92	5,34 ± 1,07	2,67 ± 0,98	3,20 ± 0,39	3,60 ± 1,00	2,13 ± 0,14
20-0	0,58 ± 0,82	1,35 ± 0,13	1,04 ± 0,72	1,13 ± 0,18	0,74 ± 0,15	0,87 ± 0,02	0,82 ± 0,12	0,80 ± 0,06
22-0	Tr	0,51 ± 0,72	0,95 ± 0,38	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-0	Tr	1,11 ± 0,79	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
AGR	8,99 ± 0,74	6,44 ± 2,20	5,05 ± 0,50	8,57 ± 0,31	9,33 ± 1,67	10,44 ± 0,67	7,93 ± 1,14	9,14 ± 0,84
16-1(n-9)	0,67 ± 0,46	Tr	-	0,59 ± 0,17	1,57 ± 0,44	1,76 ± 0,82	0,90 ± 0,04	0,77 ± 0,15
16-1(n-7)	2,21 ± 0,54	2,26 ± 1,65	1,12 ± 0,13	2,11 ± 0,56	2,81 ± 0,58	2,12 ± 1,35	2,86 ± 0,15	6,46 ± 4,38
18-1(n-9)	1,22 ± 0,61	5,75 ± 0,73	7,42 ± 0,06	5,12 ± 2,61	11,85 ± 1,35	12,36 ± 0,23	9,64 ± 0,77	10,35 ± 0,51
18-1(n-7)	Tr	1,39 ± 0,57	1,66 ± 0,29	1,25 ± 0,50	1,62 ± 0,32	-	1,14 ± 0,99	1,84 ± 0,00
20-1(n-9)	-	Tr	Tr	Tr	Tr	2,99 ± 4,22	0,54 ± 0,40	0,96 ± 0,08
20-1(n-7)	-	-	-	-	-	-	-	-
22-1(n-11)	-	-	-	-	-	-	-	-
22-1(n-9)	-	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
24-1(n-9)	Tr	-	-	Tr	Tr	0,63 ± 0,04	Tr	0,56 ± 0,08
16 PI	2,53 ± 0,71	2,71 ± 0,75	1,79 ± 1,26	2,33 ± 0,03	2,73 ± 0,10	2,45 ± 0,51	2,99 ± 0,83	6,47 ± 5,05
18-2(n-6)	Tr	4,32 ± 1,20	3,47 ± 0,14	1,77 ± 1,23	4,96 ± 1,39	6,11 ± 1,22	5,76 ± 0,67	5,87 ± 0,19
18-3(n-6)	-	-	-	Tr	Tr	0,58 ± 0,07	0,68 ± 0,10	0,86 ± 0,08
18-3(n-3)	1,07 ± 0,86	3,23 ± 1,35	2,66 ± 1,16	1,57 ± 1,18	5,47 ± 2,54	7,46 ± 1,13	6,49 ± 1,13	8,74 ± 1,17
18-4(n-3)	Tr	0,77 ± 0,36	0,75 ± 0,05	1,04 ± 1,02	4,02 ± 2,79	4,34 ± 1,78	4,91 ± 1,20	6,69 ± 0,07
20-2(n-6)	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
20-3(n-6)	0,64 ± 0,90	1,99 ± 2,82	-	-	Tr	Tr	Tr	-
20-4(n-6)	-	-	0,69 ± 0,97	Tr	Tr	Tr	0,66 ± 0,29	Tr
20-3(n-3)	0,95 ± 0,05	3,25 ± 0,20	1,59 ± 1,04	Tr	Tr	Tr	Tr	1,44 ± 0,53
20-4(n-3)	-	Tr	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr
20-5(n-3)	-	-	Tr	Tr	1,08 ± 0,71	1,67 ± 0,33	1,48 ± 0,63	2,31 ± 0,23
22-2(n-6)	-	-	-	-	Tr	Tr	-	-
22-3(n-6)	1,72 ± 0,27	-	-	0,69 ± 0,82	Tr	Tr	Tr	Tr
22-4(n-6)	-	-	-	Tr	Tr	Tr	0,71 ± 0,38	1,05 ± 0,11
22-3(n-3)	1,28 ± 0,65	0,82 ± 1,16	0,86 ± 0,71	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
22-4(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	-
22-5(n-3)	-	-	-	-	Tr	Tr	Tr	Tr
22-6(n-3)	3,39 ± 4,79	1,23 ± 0,82	1,90 ± 1,47	Tr	0,78 ± 0,70	1,21 ± 0,55	1,23 ± 0,65	2,82 ± 1,58
NI	2,12 ± 1,18	4,30 ± 1,82	5,65 ± 1,13	1,94 ± 0,98	4,17 ± 1,49	-	5,48 ± 2,73	2,72 ± 2,21
AGS	80,95 ± 2,88	66,92 ± 5,59	69,12 ± 5,54	78,78 ± 6,98	55,27 ± 8,31	54,22 ± 0,08	52,31 ± 5,68	37,99 ± 1,02
AGMI	4,70 ± 1,28	10,00 ± 2,12	10,63 ± 0,13	9,78 ± 3,96	18,81 ± 2,10	20,13 ± 1,59	15,56 ± 1,26	21,21 ± 15,20
AGPI	12,23 ± 5,34	18,79 ± 5,29	14,60 ± 4,29	9,50 ± 3,19	21,75 ± 9,09	25,66 ± 3,58	26,65 ± 4,65	38,07 ± 4,26
(n-3)	7,03 ± 5,85	9,76 ± 0,52	8,23 ± 1,60	3,58 ± 2,30	12,24 ± 7,09	15,32 ± 5,17	15,27 ± 3,91	23,23 ± 8,75
(n-6)	2,67 ± 0,19	6,31 ± 4,02	4,58 ± 1,43	3,60 ± 0,91	6,78 ± 2,14	7,88 ± 2,73	8,39 ± 1,47	8,37 ± 3,80
AGT	0,79 ± 0,05	0,49 ± 0,13	2,59 ± 0,72	4,27 ± 0,81	13,28 ± 6,12	26,45 ± 3,25	27,84 ± 4,87	19,35 ± 5,68

Tableau V 5 : Teneurs en acides gras totaux (en ng/ind.) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des glycérides extraits de la seconde génération de *Mixodiptomus laciniatus* (moyennes ± écart-types).

AGT : teneur en acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces ($\leq 0,5\%$).

des AGT), le 18:2(n-6) (entre 5,0 et 6,1% des AGT), et le 18:4(n-3) (entre 4,0 et 6,7% des AGT).

2. Composition en AG des CE extraits de *Mixodiaptomus laciniatus* de la deuxième génération

La composition en AG des CE montre de fortes variations (Tab. V 6), et il est possible de considérer trois périodes différentes, celle correspondant aux jeunes stades larvaires (NI à CIII-CIV se développant d'avril à juillet), les compositions en AG des stades CV-Ad. de septembre, et enfin celle des stades CV-Ad. de novembre.

Les principaux AG des larves NI à CIII-CIV sont les AGS dont les proportions sont comprises entre 36,6 (mai) et 55,3% (juin) des AGT, et les AGPI dont les pourcentages varient de 36,5 (juin) à 60,5% (mai) des AGT. Les AGMI sont faiblement représentés tout au long de cette période (entre 1,7% en juillet et 3,6% en juin). Les principaux AGS sont le 15:0 (19,0 à 25,8% des AGT) et le 16:0 (9,5 à 12,8% des AGT). Les AGPI sont surtout représentés par ceux de la série (n-6) (9,7 à 22,9% des AGT), en particulier le 20:2(n-6) (3,4 à 6,9% des AGT) et le 22:2(n-6) (3,8 à 6,0% des AGT) ; les AGPI à 16 atomes de carbone et le 22:6(n-3) sont présents en proportions importantes durant cette période, comprises entre 12,9 et 36,9% pour les AGPI à 16 atomes de carbone, et entre 3,8 et 6,0% des AGT pour le 22:6(n-3).

En septembre, les compositions en AG des femelles et des mâles de *Mixodiaptomus* sont représentées par d'importantes proportions d'AGS (57,9% des AGT pour les femelles, 53,7% pour les mâles) dont le principal composé est le 16:0 (22,7 et 20,7% des AGT respectivement pour les femelles et les mâles). Les AGMI représentent 13,9 et 22,7% des AGT respectivement pour les femelles et les mâles, les seuls AGMI détectés étant le 16:1(n-7) et le 18:1(n-9). Les AGPI (22,9% des AGT chez les femelles, 23,6% des AGT chez les mâles) sont essentiellement, voire uniquement représentés par les AGPI de la série (n-3), le

	avr.-02 NI	mai-02 NII-NIII	juin-02 CI-CII	juil.-02 CIII-ClV	sept.-02		nov.-02	
					CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂	CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂
14:0	3,72 ± 0,47	2,20 ± 3,12	5,87 ± 4,79	6,41 ± 9,07	12,49 ± 8,83	19,84 ± 14,47	6,51 ± 1,08	5,07 ± 1,73
15:0	18,95 ± 5,88	21,28 ± 9,89	25,81 ± 3,89	19,46 ± 5,20	6,06 ± 2,63	3,90 ± 5,52	9,04 ± 1,13	8,24 ± 2,86
16:0	10,48 ± 4,10	9,49 ± 1,17	12,83 ± 3,71	11,14 ± 2,90	22,72 ± 7,40	20,71 ± 3,30	19,19 ± 1,80	16,49 ± 1,86
17:0	0,98 ± 1,39	-	1,63 ± 2,83	-	-	-	6,01 ± 1,33	2,41 ± 1,64
18:0	3,41 ± 0,28	3,61 ± 0,59	6,65 ± 2,47	4,02 ± 0,88	16,66 ± 4,83	9,29 ± 2,33	7,56 ± 0,97	6,60 ± 2,76
20:0	1,83 ± 2,58	-	-	2,46 ± 3,48	-	-	0,93 ± 0,83	0,57 ± 0,98
22:0	4,56 ± 6,44	-	-	-	-	-	1,20 ± 1,17	0,68 ± 1,18
24:0	3,50 ± 3,21	-	2,50 ± 4,34	1,75 ± 2,47	-	-	0,94 ± 0,86	6,02 ± 4,65
AGR	1,81 ± 2,56	-	-	-	-	-	-	-
16:1(n-9)	-	-	-	-	-	-	-	-
16:1(n-7)	0,75 ± 1,06	-	-	-	2,93 ± 4,14	15,81 ± 10,98	1,01 ± 0,95	3,22 ± 3,20
18:1(n-9)	2,32 ± 0,50	2,89 ± 4,09	3,60 ± 3,35	-	11,01 ± 4,21	6,87 ± 4,90	3,37 ± 1,32	5,88 ± 2,90
18:1(n-7)	-	-	-	1,72 ± 2,43	-	-	-	0,67 ± 1,15
20:1(n-9)	-	-	-	-	-	-	-	Tr
20:1(n-7)	-	-	-	-	-	-	-	-
22:1(n-11)	-	-	-	-	-	-	-	-
22:1(n-9)	-	-	-	-	-	-	-	2,72 ± 4,72
24:1(n-9)	-	-	-	-	-	-	-	Tr
16 PI	12,85 ± 4,55	27,74 ± 1,37	21,59 ± 3,81	36,87 ± 0,11	-	-	17,37 ± 5,36	11,43 ± 7,04
18:2(n-6)	2,77 ± 3,92	-	-	-	-	-	0,82 ± 1,42	2,68 ± 0,66
18:3(n-6)	-	-	-	1,87 ± 2,64	6,57 ± 9,28	-	-	Tr
18:3(n-3)	2,39 ± 0,96	-	-	-	5,80 ± 3,73	-	2,77 ± 0,04	1,54 ± 1,38
18:4(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	0,53 ± 0,91
20:2(n-6)	6,89 ± 3,00	4,26 ± 0,72	4,66 ± 1,17	3,35 ± 0,24	-	-	4,70 ± 0,85	5,58 ± 2,15
20:3(n-6)	-	-	-	-	-	-	4,24 ± 3,97	1,03 ± 1,02
20:4(n-6)	0,98 ± 1,39	3,15 ± 1,33	-	-	-	-	1,87 ± 3,25	4,26 ± 4,80
20:3(n-3)	1,37 ± 1,94	-	-	-	-	-	Tr	Tr
20:4(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	-
20:5(n-3)	5,53 ± 7,82	-	-	-	-	-	1,54 ± 1,55	Tr
22:2(n-6)	1,59 ± 2,25	3,34 ± 0,56	5,00 ± 1,46	5,00 ± 0,32	-	-	1,23 ± 1,18	-
22:3(n-6)	3,20 ± 4,52	-	-	-	-	-	1,30 ± 1,13	3,35 ± 0,06
22:4(n-6)	-	12,14 ± 0,89	-	-	-	-	-	-
22:3(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	1,77 ± 2,19
22:4(n-3)	-	6,07 ± 2,23	1,28 ± 2,21	-	-	-	5,57 ± 4,85	-
22:5(n-3)	-	-	-	-	2,24 ± 3,17	-	-	-
22:6(n-3)	5,05 ± 3,08	3,82 ± 0,83	3,96 ± 1,52	5,95 ± 0,29	8,26 ± 2,52	23,58 ± 8,51	0,95 ± 1,64	5,57 ± 2,16
NI	5,06 ± 1,22	-	4,62 ± 1,38	-	5,25 ± 0,78	-	1,47 ± 0,45	1,88 ± 1,65
AGS	49,24 ± 19,55	36,59 ± 5,02	55,30 ± 1,95	45,24 ± 4,10	57,94 ± 14,02	53,74 ± 14,59	51,39 ± 6,59	46,09 ± 9,43
AGMI	3,07 ± 1,57	2,89 ± 4,09	3,60 ± 3,35	1,72 ± 2,43	13,94 ± 8,34	22,68 ± 6,08	4,38 ± 0,61	13,30 ± 12,62
AGPI	42,63 ± 16,77	60,52 ± 0,93	36,49 ± 1,74	53,04 ± 1,67	22,87 ± 4,90	23,58 ± 8,51	42,77 ± 5,54	38,74 ± 4,33
(n-3)	14,35 ± 7,64	9,89 ± 3,05	5,24 ± 2,85	5,95 ± 0,29	16,31 ± 4,39	23,58 ± 8,51	11,24 ± 6,08	10,07 ± 4,13
(n-6)	15,43 ± 4,57	22,89 ± 3,49	9,66 ± 0,43	10,22 ± 2,08	6,57 ± 9,28	-	14,16 ± 1,57	17,24 ± 6,71
AGT	0,36 ± 0,04	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,35 ± 0,05	0,36 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,63 ± 0,12	0,44 ± 0,07

Tableau V 6 : Teneurs en acides gras totaux (en ng/ind.) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des cérides extraits de la seconde génération de *Mixodiptomus laciniatus* (moyennes ± écart-types).

AGT : teneur en acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces ($\leq 0,5\%$).

principal composé étant le 22:6(n-3) (8,3% des AGT chez les femelles, 23,6% des AGT chez les mâles).

En novembre, la composition en AG des CE des stades CV-Ad. est plus diversifiée qu'en septembre, les principaux AG étant les AGS qui constituent 51,4% des AGT chez les femelles et 46,1% des AGT chez les mâles, et qui sont majoritairement représentés par le 16:0 (19,2 et 16,5% des AGT respectivement chez les femelles et les mâles). Les AGMI constituent une faible proportion des AGT (4,4% chez les femelles, 13,3% chez les mâles) et sont principalement représentés par le 18:1(n-9). Les proportions d'AGPI sont élevées (42,8% chez les femelles, 38,7% chez les mâles), ceux de la série (n-6) étant légèrement plus abondants (14,2% chez les femelles, 17,2% chez les mâles) que ceux de la série (n-3) (11,2% chez les femelles, 10,1% chez les mâles). Les AGPI majoritaires sont ceux à 16 atomes de carbone (17,4% chez les femelles, 11,4% chez les mâles).

3. Composition en AG des PL extraits de *Mixodiptomus laciniatus* de la deuxième génération

Les compositions en AG des PL extraits des premiers stades de développement (Tab. V 7) présents d'avril à juillet (NI à CIII-CIV), sont caractérisées par de fortes proportions d'AGS (de 48,6% en juin à 84,2% des AGT en juillet), dont les principaux représentants sont le 16:0 (entre 26,0 et 42,5% des AGT) et le 18:0 (entre 8,6 et 19,5% des AGT). Les AGMI sont faiblement représentés, avec des proportions comprises entre 0,5 (juillet) et 15,1% des AGT (juin), le principal AGMI étant le 18:1(n-9) (de 0,5 à 6,0% des AGT). Les AGPI représentent entre 13,1% (juillet) et 39,5% des AGT (mai), ils sont principalement constitués d'AG de la série (n-3) (entre 3,2 et 26,0% des AGT) ainsi que des AGPI à 16 atomes de carbone (3,1 à 10,1% des AGT).

	avr.-02 NI	mai-02 NII-NIII	juin-02 CI-CII	juil.-02 CIII-CIV	sept.-02		nov.-02	
					CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂	CV-Ad. ♀	CV-Ad. ♂
14:0	5,65 ± 0,32	3,71 ± 0,57	4,08 ± 1,66	8,08 ± 1,47	5,79 ± 1,70	6,25 ± 0,27	6,73 ± 0,63	4,95 ± 1,35
15:0	4,39 ± 2,24	1,77 ± 1,35	0,83 ± 1,18	1,78 ± 0,24	3,67 ± 0,90	2,74 ± 0,07	2,90 ± 0,06	1,99 ± 0,99
16:0	34,16 ± 7,53	29,53 ± 2,97	26,01 ± 3,67	42,49 ± 1,64	29,34 ± 0,37	26,10 ± 1,39	27,75 ± 2,25	22,18 ± 0,55
17:0	1,22 ± 1,72	1,72 ± 0,12	1,84 ± 0,24	3,85 ± 1,54	3,46 ± 0,81	2,62 ± 0,03	2,57 ± 0,59	1,70 ± 0,08
18:0	13,22 ± 1,65	9,29 ± 0,10	8,60 ± 0,94	19,53 ± 2,78	8,82 ± 0,23	4,36 ± 6,17	8,02 ± 1,63	7,42 ± 0,28
20:0	-	-	1,29 ± 1,83	-	Tr	-	-	0,72 ± 0,05
22:0	0,91 ± 1,28	1,23 ± 0,26	2,10 ± 0,61	2,73 ± 3,86	1,09 ± 0,30	Tr	0,80 ± 0,08	1,10 ± 0,36
24:0	1,32 ± 1,87	0,68 ± 0,96	1,83 ± 2,58	1,38 ± 1,95	1,02 ± 0,20	0,67 ± 0,03	0,74 ± 0,16	1,12 ± 0,07
AGR	2,17 ± 3,08	2,68 ± 0,89	2,00 ± 0,01	4,36 ± 0,65	6,24 ± 5,30	6,69 ± 1,31	4,20 ± 1,95	4,36 ± 0,56
16:1(n-9)	-	-	-	-	-	-	0,54 ± 0,76	0,77 ± 0,29
16:1(n-7)	1,11 ± 1,56	-	1,44 ± 2,03	-	3,08 ± 2,27	0,97 ± 0,16	1,13 ± 0,19	0,99 ± 0,39
18:1(n-9)	3,36 ± 1,62	4,34 ± 1,16	5,99 ± 4,07	0,51 ± 0,72	5,70 ± 0,91	9,46 ± 4,86	8,12 ± 1,13	8,10 ± 0,01
18:1(n-7)	-	0,81 ± 1,15	7,63 ± 2,94	-	1,09 ± 1,54	1,98 ± 0,39	-	1,03 ± 1,46
20:1(n-9)	-	-	-	-	-	0,90 ± 1,28	Tr	Tr
20:1(n-7)	-	-	-	-	-	-	-	-
22:1(n-11)	-	-	-	-	-	-	-	-
22:1(n-9)	-	2,05 ± 1,01	-	-	-	Tr	-	-
24:1(n-9)	-	1,59 ± 0,17	-	-	4,77 ± 0,95	4,66 ± 0,59	2,68 ± 0,13	0,80 ± 0,02
16 PI	10,12 ± 2,90	5,74 ± 1,10	3,13 ± 0,73	7,97 ± 1,78	Tr	0,68 ± 0,96	2,92 ± 0,48	3,64 ± 0,05
18:2(n-6)	1,40 ± 1,98	4,11 ± 0,41	2,74 ± 1,80	-	4,42 ± 0,43	4,57 ± 0,18	3,54 ± 0,15	3,56 ± 0,03
18:3(n-6)	-	-	-	-	0,77 ± 1,08	-	-	Tr
18:3(n-3)	1,90 ± 2,68	5,07 ± 0,89	5,17 ± 3,86	-	3,34 ± 0,25	4,23 ± 0,08	3,61 ± 0,46	3,20 ± 0,03
18:4(n-3)	-	1,22 ± 1,73	-	-	1,04 ± 0,46	0,69 ± 0,97	2,03 ± 0,60	0,93 ± 1,31
20:2(n-6)	3,11 ± 1,72	1,17 ± 1,65	-	-	3,11 ± 4,39	5,54 ± 2,27	Tr	Tr
20:3(n-6)	-	-	-	-	0,81 ± 1,14	Tr	-	-
20:4(n-6)	-	-	-	-	2,06 ± 0,12	1,45 ± 2,05	-	-
20:3(n-3)	-	1,99 ± 0,34	1,15 ± 1,63	0,80 ± 1,14	-	2,04 ± 1,67	2,03 ± 0,36	3,18 ± 0,07
20:4(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	Tr
20:5(n-3)	1,47 ± 2,08	4,18 ± 0,61	2,78 ± 0,33	-	2,15 ± 0,73	4,00 ± 0,29	3,82 ± 0,47	6,88 ± 0,32
22:2(n-6)	2,45 ± 0,08	1,61 ± 1,15	3,86 ± 0,18	-	-	-	-	-
22:3(n-6)	-	-	-	0,64 ± 0,91	-	-	Tr	0,57 ± 0,80
22:4(n-6)	2,76 ± 3,90	0,86 ± 1,21	-	1,26 ± 1,78	Tr	1,08 ± 0,38	1,80 ± 0,32	2,62 ± 0,03
22:3(n-3)	1,66 ± 2,35	6,84 ± 4,87	7,21 ± 4,52	2,43 ± 0,13	Tr	Tr	2,82 ± 1,12	4,14 ± 0,09
22:4(n-3)	-	-	-	-	-	-	-	-
22:5(n-3)	5,43 ± 0,81	2,45 ± 1,22	2,36 ± 0,26	-	-	-	-	-
22:6(n-3)	1,06 ± 1,50	4,26 ± 0,17	4,54 ± 1,44	-	1,93 ± 0,92	4,01 ± 0,27	4,98 ± 0,87	8,95 ± 0,31
NI	1,14 ± 1,61	1,09 ± 1,54	3,43 ± 1,09	2,18 ± 0,15	4,58 ± 0,75	2,97 ± 1,69	5,01 ± 2,14	3,92 ± 1,81
AGMI	4,46 ± 0,05	8,79 ± 1,12	15,06 ± 0,91	0,51 ± 0,72	14,64 ± 1,95	18,36 ± 7,04	12,85 ± 2,49	12,02 ± 2,00
AGPI	31,35 ± 11,72	39,51 ± 2,44	32,93 ± 11,12	13,11 ± 5,74	20,88 ± 8,00	28,87 ± 2,17	28,45 ± 2,54	38,51 ± 1,43
(n-3)	11,52 ± 4,72	26,02 ± 2,36	23,20 ± 8,77	3,23 ± 1,27	8,85 ± 1,80	15,22 ± 2,22	19,30 ± 1,77	27,66 ± 0,02
(n-6)	9,72 ± 4,09	7,75 ± 1,18	6,60 ± 1,62	1,90 ± 2,69	11,55 ± 5,53	12,98 ± 0,91	6,23 ± 0,29	7,21 ± 1,46
AGT	0,12 ± 0,07	0,37 ± 0,08	0,35 ± 0,15	0,53 ± 0,13	10,23 ± 5,27	17,20 ± 1,10	1,60 ± 0,81	1,30 ± 0,10

Tableau V 7 : Teneurs en acides gras totaux (en ng/ind.) et composition en acides gras (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des phospholipides extraits de la seconde génération de *Mixodiptomus laciniatus* (moyennes ± écart-types).

AGT : teneur en acides gras totaux ; AGR : somme des pourcentages des acides gras ramifiés ; 16 PI : somme des pourcentages des acides gras polyinsaturés à 16 atomes de carbone non identifiés ; NI : somme des pourcentages des acides gras non identifiés ; AGS, AGMI, AGPI : sommes des pourcentages des acides gras saturés, monoinsaturés et polyinsaturés ; (n-3), (n-6) : sommes des pourcentages des acides gras polyinsaturés des séries (n-3) et (n-6) ; Tr : traces ($\leq 0,5\%$).

En septembre et novembre, les PL des stades CV-Ad. sont constitués de 45,6 (mâles de novembre) à 59,9% (femelles de septembre) d'AGS, dont le principal composé est le 16:0 (22,2 à 29,3% des AGT) ; les AGR sont ici présents en proportions assez importantes (4,2 à 6,7% des AGT). Les proportions en AGMI varient entre 12,0 (mâles de novembre) et 18,4% des AGT (mâles de septembre), ils sont majoritairement constitués par le 18:1(n-9) dont les valeurs sont comprises entre 5,7 et 9,5% des AGT. Les AGPI, dont les proportions varient entre 20,9 et 38,5% des AGT, présentent comme AG principaux le 20:5(n-3) (2,2 à 6,9% des AGT) et le 22:6(n-3) (1,9 à 9,0% des AGT). Il faut aussi noter que les proportions relatives en AGPI (n-3) augmentent en novembre chez les deux sexes (19,3% chez les femelles, 27,7% chez les mâles, contre 8,9 et 15,2% respectivement chez les femelles et les mâles de septembre).

4. Importance des procaryotes et des eucaryotes bactérivores dans le régime alimentaire de *Mixodiaptomus laciniatus*

Lors de l'analyse des compositions en AG des différentes classes de taille de la MOP (chapitre IV), nous avons vu que la somme des AG en C15 et C17 préconisée par Claustre et al. (1992) pouvait être utilisée pour caractériser de façon satisfaisante la biomasse des organismes procaryotes (picocyanobactéries et bactéries hétérotrophes) et des HNF bactérivores du milieu étudié ici. La recherche de ces AG dans le zooplancton pourrait donc nous permettre de savoir si les individus de la seconde génération de *M. laciniatus* se nourrissent de tels organismes procaryotes ou eucaryotes bactérivores. En effet, l'étude des marqueurs chémotaxonomiques de la MOP nous a permis d'observer que les HNF pouvaient, conformément à des études antérieures menées dans d'autres milieux (Ederington et al., 1995 ; Desvillettes et al., 1997a ; Harvey et al., 1997 ; Véra et al., 2001), accumuler les AG bactériens à la suite d'une activité phagotrophe sur les procaryotes.

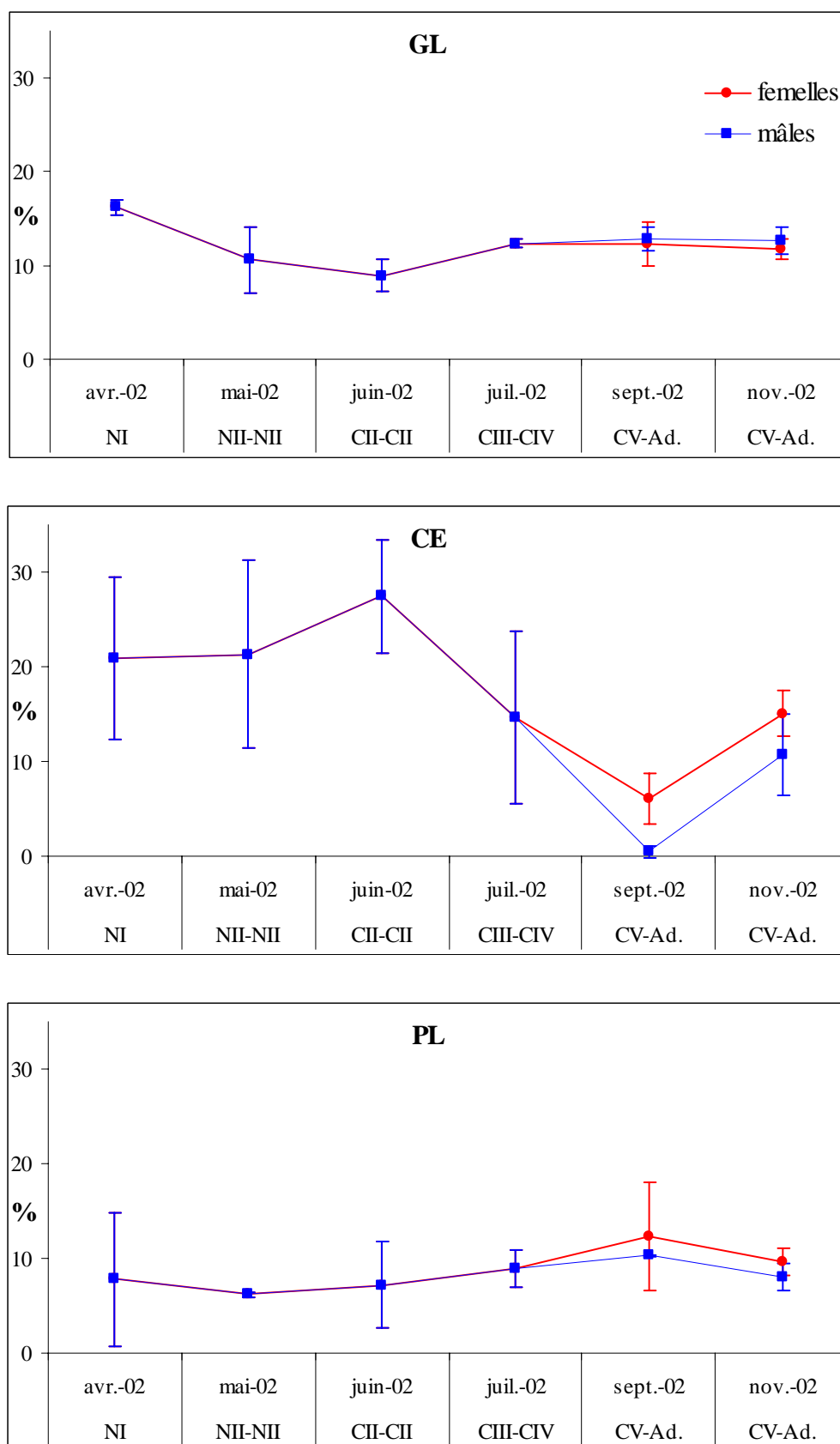


Figure V 4 : Variations des proportions relatives en AG C15 + C17 (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des glycérides, des cérides et des phospholipides extraits de *Mixodiaptomus laciniatus* de la seconde génération (moyennes \pm écart-types).

La figure V 4 représente les variations des proportions en AG en C15 + C17 dans les GL, les CE et les PL du copépode. Les proportions de ces AG sont relativement élevées au sein de chaque classe de lipide ; pour les femelles, les valeurs moyennes sont de 12,0% dans les GL, 17,6% dans les CE et 8,7% dans les PL ; pour les mâles, elles sont de 12,3% dans les GL, 15,9% dans les CE, et 8,1% dans les PL. Ces valeurs élevées, en particulier dans les lipides de réserve (CE et GL), sont probablement le reflet de l'ingestion de procaryotes libres ou attachés à des particules ou de HNF par *Mixodiaptomus*. Dans les GL, les proportions en ces AG varient très peu. Par contre, dans les CE, ces teneurs sont élevées jusqu'au mois de juin (stades NI à CI-CII), puis elles chutent jusqu'en septembre pour atteindre à cette date 6,1% des AGT chez les femelles et 0,5% des AGT chez les mâles. Ces importantes variations pourraient être liées à un changement de régime alimentaire au cours du développement larvaire, avec une ingestion importante de HNF et/ou de procaryotes jusqu'en juin, puis une diminution du broutage de *Mixodiaptomus* sur ces organismes à partir de juillet.

5. Identification des principales sources d'AGPI (n-3) pour la deuxième génération de *Mixodiaptomus laciniatus*

Les proportions d'AGPI (n-3) au sein des différentes classes de lipides de *Mixodiaptomus* présentent d'importantes variations tout au long de la période d'étude (Fig. V 5). Ainsi, dans chacune des trois classes de lipides, les proportions d'AGPI (n-3) s'accroissent en septembre et novembre simultanément chez les deux sexes. Cette augmentation dans les GL, les CE et les PL est essentiellement liée à l'élévation des proportions de 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) (Tab. V 5, 6, 7). A ce sujet, nous avons vu précédemment (chapitres I et IV) que ces AG pouvaient provenir de groupes phytoplanctoniques particuliers. Ainsi, les chlorophycées sont riches en 16:2(n-6), 16:3(n-3), 16:4(n-3) et 18:3(n-3) (Volkman et al., 19879 ; Johns et al., 1979 ; Pohl, 1982 ; Scribe et al., 1991). Lors de l'analyse des

compositions en AG des différentes classes de taille de la MOP du lac de La Godivelle-d'en-Haut (chapitre IV), nous avons obtenu une relation significative entre la biomasse de ces algues au sein de chaque classe de taille et les concentrations en 18:3(n-3). Nous en avons donc conclu que, pour notre étude, le 18:3(n-3) semblait être un marqueur satisfaisant des chlorophycées. Ces algues forment dans le milieu un net bloom en septembre et novembre (chapitre IV), concomitant à l'augmentation des proportions en 18:3(n-3) dans les GL, les CE et les PL de *Mixodiaptomus* (Tab. V 5, 6, 7). Il est donc fort probable que l'accumulation de cet AG dans les lipides du copépode soit la conséquence de l'ingestion de chlorophycées à la période où elles sont le plus abondantes dans le milieu.

De la même manière, les cryptophycées, les dinophycées et les chrysophycées possèdent des quantités importantes de 18:4(n-3), de 20:5(n-3) et de 22:6(n-3) (Pohl & Zurheide, 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Nichols et al., 1984 ; Ahlgren et al., 1990 ; Sargent et al., 1995 ; Napolitano, 1998). Or, la biomasse des chrysophycées est très faible dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut (chapitre IV) ; de plus, les biomasses maximales des cryptophycées et des dinophycées sont atteintes en automne, elles sont de 26,6 µg C/l pour les cryptophycées en septembre, et de 20,2 µg C/l pour les dinophycées en novembre. Il est donc possible que l'augmentation simultanée des proportions en 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) reflète l'ingestion par *Mixodiaptomus* de cryptophycées et/ou de dinophycées. Il faut cependant noter que ces AG peuvent être également produits par les copépodes selon des mécanismes d'élongations / désaturations à partir du 18:3(n-3) d'origine alimentaire (Kanazawa et al., 1979 ; Sargent & Whittle, 1981 ; Desvillettes et al., 1997b).

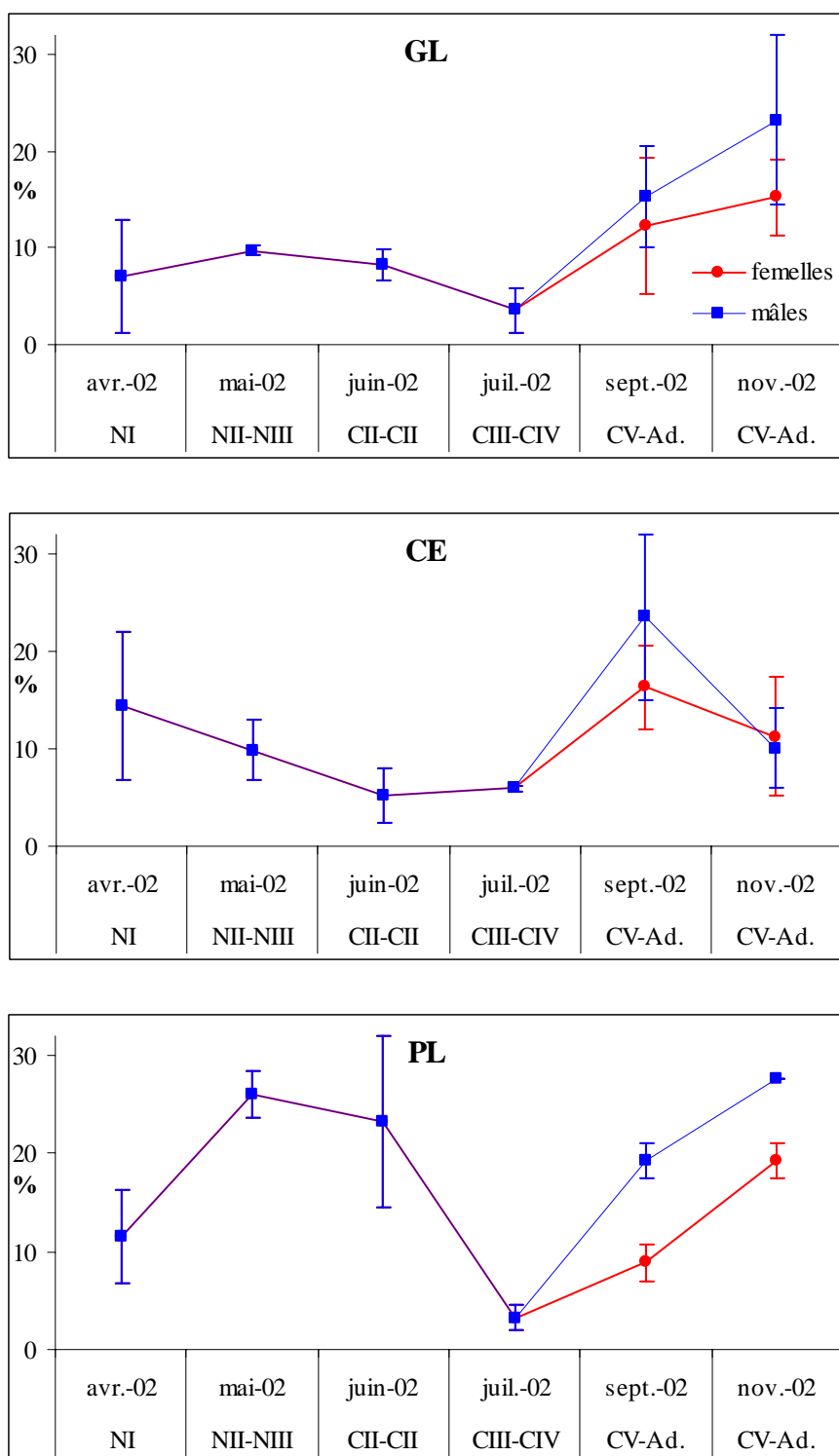


Figure V 5 : Variations des proportions relatives en AGPI (n-3) (en pourcentage du poids des acides gras totaux) des glycérides, des cérides et des phospholipides extraits de la deuxième génération de *Mixodiaptomus laciniatus* (moyennes \pm écart-types).

6. Conclusion

Nos résultats concernant les compositions en AG de *Mixodiaptomus laciniatus* suggèrent que les différents stades de développement du copépode s'alimenteraient sur les composantes microbiennes les plus abondantes dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut. En effet, les proportions importantes en AG en C15 + C17 dans ses lipides de réserve (TG et CE), en particulier jusqu'au mois de juin, supposent que les jeunes larves de *Mixodiaptomus* ingèreraient essentiellement des HNF bactériovores et/ou des organismes procaryotes libres ou attachés à des particules, organismes prépondérants en terme de biomasse à cette période de l'étude (chapitre IV). Cependant, ces proportions d'AG en C15 + C17 diminuent, en particulier dans les CE, parallèlement à l'augmentation des AGPI (n-3) en septembre et novembre. En effet, c'est à cette période de l'étude que la biomasse phytoplanctonique est la plus élevée, et qu'elle est principalement constituée de chlorophycées, et dans une moindre mesure, de flagellés autotrophes (cryptophycées et dinophycées). Les fortes proportions en 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3) relevées dans les lipides des stades CV-Ad. de *M. laciniatus* en automne suggèrent donc une nutrition importante sur les chlorophycées, et probablement sur les flagellés autotrophes présents à cette période dans le milieu. Toutefois, l'ingestion de ces flagellés autotrophes demeure non confirmée car leurs AG majoritaires (18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3)) peuvent aussi être synthétisés par le copépode à partir du 18:3(n-3) provenant de l'ingestion de chlorophycées. A ce sujet, il faut cependant noter l'augmentation des proportions relatives en 18:1(n-9) dans les CE de *Mixodiaptomus* en septembre et novembre. Ce composé, très abondant chez les flagellés auto- et hétérotrophes (Reuss & Poulsen, 2002), les rotifères et les nauplii de copépodes (Falk-Petersen et al., 2000), ou encore dans les particules détritiques (Scott et al., 2002), pourrait renforcer l'hypothèse de l'ingestion de flagellés autotrophes chez les stades de développement les plus âgés du copépode.

C. Stérols

L'étude de la composition relative en ST de *Mixodiaptomus laciniatus* (Tab. V 8) montre que le composé majoritairement détecté est le cholestérol. Ses proportions, comprises entre 21,2 (juin) et 100% (mai, femelles de novembre), sont caractéristiques de celles rapportées chez les crustacés et notamment chez les copépodes (Goad, 1981 ; Ederington et al., 1995 ; Grice et al., 1998 ; Phleger et al., 1998, 2002). En effet, le cholestérol est généralement le stérol dominant chez ces organismes (Goad, 1981), et il est parfois accompagné de faibles proportions d'autres stérols reflétant la contribution des différentes sources de nourriture (Harvey et al., 1987). Ainsi, certains composés peuvent ponctuellement constituer une part importante des stérols de *Mixodiaptomus* : c'est le cas par exemple du campestérol, du stigmastérol et du β -sitostérol qui représentent respectivement 11,1, 10,4 et 15,5% des ST totaux en avril et 16,1, 15,0 et 17,0% des ST totaux en juin ; certains ou même tous ces stérols sont aussi présents à d'autres dates d'échantillonnage, mais en proportions relativement plus faibles (juillet, septembre et novembre). Ces trois composés, connus pour être les principaux stérols des chlorophycées (Volkman, 1986), ont été utilisés, lors de la caractérisation de la biomasse microbienne de La Godivelle-d'en-Haut (chapitre IV), pour estimer les variations de biomasse de ces microalgues dans le lac. Etant donné que le zooplancton est incapable de néosynthétiser le campestérol, le stigmastérol et le β -sitostérol (Kanazawa, 1984 ; Teshima, 1991), la présence de ces composés chez *Mixodiaptomus* pourrait être le signe de l'ingestion de chlorophycées par celui-ci en avril, juin, juillet, septembre et novembre.

Le trans-22-dehydrocholestérol peut aussi parfois représenter une proportion non négligeable des stérols zooplanctoniques. C'est notamment le cas en avril et en juin, dates pour lesquelles il constitue respectivement 9,7 et 10,0% des ST totaux. Ce composé est communément utilisé comme marqueur des diatomées (Orcutt & Patterson, 1975 ; Volkman et al., 1980a) ;

cependant, les biomasses très faibles de ces microalgues rencontrées dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut tout au long de l'étude ne nous ont pas permis de les caractériser à l'aide du trans-22-dehydrocholestérol (chapitre IV). Toutefois, ce composé ne peut pas être synthétisé *de novo* par les crustacés zooplanctoniques (Kanazawa, 1984 ; Teshima, 1991), sa présence à certaines dates de prélèvement chez *Mixodiaptomus* révèle donc très probablement l'ingestion de ces algues par le copépode.

Enfin, il faut noter que nous avons décelé du fucostérol en avril, juin et septembre chez les femelles. Ce composé n'a été détecté dans les échantillons de zooplancton qu'en présence de β -sitostérol. Or, nous avons vu précédemment que les composés en C₂₈ et en C₂₉, dont le β -sitostérol fait partie, peuvent subir une désalkylation en C₂₄ chez les crustacés, celle-ci conduisant à la formation de cholestérol (chapitre I). Or, le fucostérol est un intermédiaire de désalkylation du β -sitostérol en cholestérol, et sa présence en parallèle de celle du β -sitostérol pourrait par conséquent être liée à la désalkylation de ce dernier chez *Mixodiaptomus*.

	avr.-02	mai-02	juin-02	juil-02	sept.-02		nov.-02	
	NI	NI-II-III	CI-CII	CIII-IV	CV-♀	CV-♂	CV-♀	CV-♂
22-Dehydro.	9,73 ± 0,45	-	9,96 ± 3,43	-	0,75 ± 0,07	0,99 ± 0,35	-	-
24-Norcholesta.	-	-	-	-	-	-	-	0,65 ± 0,21
Cholestérol	41,32 ± 9,62	100,00 ± 0,00	21,15 ± 0,04	98,86 ± 0,33	96,74 ± 0,13	95,63 ± 1,73	100,00 ± 0,00	97,51 ± 0,98
Campestérol	11,14 ± 2,26	-	16,10 ± 4,39	-	0,86 ± 0,01	0,97 ± 0,51	-	0,77 ± 0,30
Stigmastérol	10,40 ± 1,73	-	15,01 ± 1,12	-	-	1,71 ± 0,76	-	-
β-Sitostérol	15,46 ± 6,42	-	16,96 ± 3,23	1,14 ± 0,33	0,91 ± 0,17	0,70 ± 0,11	-	1,07 ± 0,47
Fucostérol	11,95 ± 2,21	-	20,81 ± 1,11	-	0,74 ± 0,02	-	-	-
ST totaux	0,41 ± 0,07	0,04 ± 0,01	0,29 ± 0,03	6,11 ± 1,53	12,64 ± 2,87	9,82 ± 4,31	8,10 ± 3,37	9,70 ± 3,33

Tableau V 8 : Composition en stérols (en pourcentage du poids des stérols totaux) et poids des stérols totaux (en ng/ind.) de la seconde génération de *Mixodiaptomus laciniatus* (moyennes ± écart-types).

22-Dehydro. : trans-22-Dehydrocholestérol ; 24-Norcholesta. : 24-Norcholesta-5,22-(E)-dien-3β-ol.

D. Conclusion

De nombreuses études ont utilisé les marqueurs lipidiques et pigmentaires pour visualiser les relations trophiques existant entre le zooplancton et les microorganismes présents dans leur milieu environnant (Kleppel & Pieper, 1984 ; Claustre et al., 1989 ; Falk-Petersen et al., 1990 ; Ahlgren et al., 1990, 1997 ; Kleppel et al., 1991 ; Bautista et al., 1992 ; Head, 1992 ; Head & Harris, 1994 ; Kattner et al., 1994 ; Quiblier et al., 1994 ; Desvillettes et al., 1997a, b ; Lévillé, 1997 ; Fundel et al., 1998 ; Grice et al., 1998 ; Nanton & Castell, 1998 ; Napolitano, 1998 ; Beghin, 1999 ; Descy et al., 1999 ; Pandolfini et al., 2000 ; Nelson et al., 2001 ; Scott et al., 2002 ; Bec, 2003 ; Thys et al., 2003). En revanche, l'utilisation simultanée de plusieurs biomarqueurs est moins fréquente. L'utilisation conjointe des AG et des ST a permis d'apprécier le régime alimentaire du zooplancton (Neal et al., 1986 ; Ederington et al., 1995 ; Phleger et al., 1998, 2002 ; Nelson et al., 2001 ; Ju & Harvey, 2004) ; Cotonnec et ses collaborateurs (2001) ont également analysé les compositions en pigments et en AG de copépodes et de la MOP afin de caractériser les relations liant ces deux compartiments en milieu estuarien. Toutefois, à notre connaissance, l'étude présentée ici est la première utilisant parallèlement ces trois types de composés en milieu lacustre.

Les analyses pigmentaires réalisées en laboratoire nous ont permis de savoir quels types d'algues présentes dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut étaient susceptibles d'être ingérées par *Mixodiaptomus* et quelles étaient ses préférences alimentaires. Ainsi, les picocyanobactéries, dont les biomasses sont très élevées tout au long de la période d'étude dans le lac, ne sont pas ingérées par le copépode, quel que soit son stade de développement. Concernant les préférences alimentaires du calanoïde, celles-ci dépendent du stade de développement considéré : les larves semblent sélectionner activement les chlorophycées et les cryptophycées alors que les adultes orientent plutôt leur choix vers les cryptophycées et les diatomées.

Les analyses pigmentaires du zooplancton effectuées en milieu naturel, malgré l'absence de détection de pigments marqueurs à certaines dates d'échantillonnage, ont permis d'identifier un certain nombre de proies ingérées par le copépode : les pigments des chlorophycées ont été retrouvés chez les adultes en juin et juillet, chez les larves en avril, juin, juillet et novembre. Ceux des diatomées ont été retrouvés chez les adultes en juin et juillet et chez les larves en avril, juin et juillet. Enfin, les pigments des cryptophycées ont été identifiés chez les adultes en juillet et chez les larves en novembre. D'après cette étude des contenus digestifs de *Mixodiaptomus* en milieux expérimental et naturel, il semble donc que les proies phytoplanctoniques préférentiellement ingérées sont les chlorophycées, les diatomées et les cryptophycées ; ainsi, celles-ci seraient activement recherchées par le copépode malgré le fait que ces microalgues peuvent être présentes dans le lac à des biomasses parfois très faibles.

Les compositions en AG des lipides de réserve (GL et CE) et des phospholipides de la seconde génération nous ont permis de remarquer que les HNF et/ou les procaryotes constituaient également une part importante de la nourriture ingérée par *Mixodiaptomus*, en particulier par les jeunes stades larvaires NI (avril) à CIII-CIV (juillet). Or, les expériences menées en laboratoire suggèrent que les picocyanobactéries sont évitées par tous les stades de développement du copépode. Etant donné que les biomarqueurs chémotaxonomiques que nous avons utilisés ne nous permettent pas de distinguer l'ingestion de bactéries hétérotrophes de celles des flagellés bactériovores, il nous est par conséquent impossible de savoir lequel de ces deux types d'organismes a été brouté par *Mixodiaptomus*. De plus, l'alimentation des calanoïdes est un phénomène complexe régi d'une part par la taille des particules pouvant réellement être ingérées par le copépode (dépendant de la morphologie de son appareil buccal), et d'autre part par des mécanismes de sélectivité du calanoïde vis-à-vis de tel ou tel type de proie. Or, il n'existe à notre connaissance aucune étude concernant la gamme de taille des particules pouvant être ingérées par *M. laciniatus* ; nous ne pouvons donc pas savoir si les

picocyanobactéries et les bactéries hétérotrophes présentes dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut sont de trop petite taille pour pouvoir être ingérées par ce copépode. De plus, le régime alimentaire des calanoïdes dépend de nombreux autres facteurs liés à l'espèce, au stade de développement et au sexe du copépode (Landry, 1983 ; Dexter, 1986 ; Tackx et al., 1990 ; Green et al., 1992), mais également à la saison (Quiblier-Llobéras et al., 1996a), la composition biochimique de la proie (Sykes & Huntley, 1987 ; Cowles et al., 1988 ; DeMott, 1988), sa digestibilité, ses propriétés gustatives (DeMott, 1988), sa toxicité (Hansen & Boeckel, 1991 ; Gasparini et al., 2000), sa forme, sa mobilité (DeMott & Watson, 1991). Dans l'état actuel de nos connaissances, il nous est par conséquent impossible de savoir si *Mixodiaptomus* ingère des flagellés bactériovores ou bien des bactéries hétérotrophes libres ou attachées à des particules.

Enfin, les lipides du calanoïde sont riches en AGPI (n-3), ceux-ci provenant en grande partie de la nourriture algale telle que les chlorophycées et probablement les flagellés autotrophes (cryptophycées et/ou dinophycées). Ainsi, nous avons observé une forte augmentation des teneurs en AG caractéristiques de ces microalgues phytoplanctoniques chez *Mixodiaptomus* en septembre et novembre, période où nous avons relevé un bloom de chlorophycées, mais aussi une augmentation de la biomasse des flagellés autotrophes (chapitre IV).

Enfin, l'analyse des compositions en ST de la seconde génération du calanoïde confirme que celui-ci ingère des chlorophycées et des diatomées.

Comme nous l'avons souligné précédemment (chapitres I, IV, V), l'utilisation d'un seul type de biomarqueur lipidique ou pigmentaire pour étudier les relations trophiques microorganismes – zooplancton présente un certain nombre d'inconvénients : chaque type de composé ne peut caractériser toutes les composantes de la MOP (par exemple, les pigments ne sont présents que chez les organismes autotrophes et les stérols uniquement chez les eucaryotes) et ne peut avoir qu'une relative spécificité (par exemple, 18:4(n-3), 20:5(n-3) et

22:6(n-3) communs aux cryptophycées, dinophycées et chrysophycées). De plus, la stabilité de ces composés lors de leur transfert au zooplancton est relative ; par exemple, les pigments peuvent être dégradés lors de leur passage dans le tractus digestif des copépodes, certains AG peuvent subir des élongations et des désaturations, ou encore les stérols en C₂₈ et C₂₉ peuvent être désalkylés. L'utilisation conjointe de chacun de ces trois types de composés devrait donc permettre dans ce contexte d'environnement trophique hétérogène d'obtenir des informations complémentaires.

Ainsi, nous avons retrouvé, lors de l'étude des biomarqueurs présents chez *Mixodiaptomus*, des points de concordance entre chacun des trois types de composés (Tab. V 9) : par exemple, les larves de *Mixodiaptomus* présentent les marqueurs pigmentaires et stéroliques des chlorophycées et des diatomées en avril et en juin ainsi que les AG et pigments caractéristiques des cryptophycées en novembre. De la même manière, comme nous l'avons largement souligné précédemment, l'analyse des compositions en AG a montré l'importance des procaryotes et/ou des flagellés bactériovores dans le régime alimentaire du copépode ; l'expérience de nutrition ayant écarté la possibilité de l'ingestion de picocyanobactéries par celui-ci, on peut par conséquent supposer que ces AG proviennent de flagellés bactériovores et/ou de bactéries hétérotrophes.

	avr.-02 NI	mai-02 NII-NIII	juin-02 CI-CII	juil.-02 CIII-CIV	sept.-02 CV-Ad.	nov.-02 CV-Ad.
pigments	-	chlorophycées	chlorophycées diatomées	chlorophycées diatomées	-	chlorophycées
acides gras	procaryotes /HNF	procaryote s/HNF	procaryotes /HNF	-	chlorophycées cryptophycées/ dinophycées	chlorophycées cryptophycées/ dinophycées
stérols	chlorophycées diatomées	-	chlorophycées diatomées	chlorophycées	chlorophycées diatomées	chlorophycées

Tableau V 9 : Marqueurs chémotaxonomiques de type pigments, acides gras et stérols retrouvées chez la seconde génération de *Mixodiptomus laciniatus*.

II. Métabolisme lipidique de *Mixodiaptomus laciniatus*

Afin de déterminer le rôle des différentes classes lipidiques dans le cycle biologique de *Mixodiaptomus laciniatus*, nous allons en premier lieu analyser la composition lipidique des femelles et des mâles de la première génération en période de reproduction, puis celle des copépodes de la seconde génération au cours de leur croissance, c'est-à-dire des stades NI (avril) aux stades CV-Ad. de novembre. Il faut noter qu'à certaines dates d'échantillonnage, les femelles reproductrices de la première génération portent les œufs. Nous avons choisi de ne pas les séparer et d'étudier les compositions lipidiques des femelles avec leur ponte afin d'observer une éventuelle allocation des lipides aux œufs par les femelles.

A. Métabolisme lipidique et reproduction

1. Composition lipidique des femelles reproductrices

a. Teneurs en lipides totaux et des différentes classes de lipides

La figure V 6 représente les teneurs en lipides totaux ainsi que celles des différentes classes de lipides détectées chez les femelles de la première génération en période de reproduction. Ainsi, les lipides des femelles sont principalement représentés par les CE et les TG qui constituent ensemble près de 80% des lipides totaux à chaque date ; les phospholipides représentent également une proportion importante des lipides totaux, les autres classes lipidiques (AGL, MG, DG, ST) étant minoritaires quelque soit la date d'échantillonnage.

Les teneurs en lipides totaux des femelles en période de maturation sexuelle et de reproduction sont comprises entre 344,8 et 1020,5 ng/ind.. Celles-ci sont élevées au mois de mars (734,9 ng/ind.) au début de la maturation sexuelle, puis ces valeurs diminuent en avril et mai (respectivement 417,5 et 344,8 ng/ind.), au moment où ont lieu la reproduction et les premières pontes. Après la période de maturation sexuelle et de reproduction proprement dite

(mars à mai), les teneurs en lipides totaux sont reconstituées à partir du mois de juin (481,2 ng/ind.).

Pour pouvoir comparer les teneurs date à date de chacune des principales classes de lipides (CE, TG et PL), nous avons réalisé des ANOVA à un facteur. Ainsi, les teneurs en phospholipides restent stables tout au long de la période de reproduction, aucune différence significative n'ayant été observée lors de la comparaison de ces valeurs date à date. Etant donné qu'il n'y a pas eu de croissance corporelle importante des femelles pendant cette période de reproduction (la mue des stades CV en adultes concerne plutôt la maturation des organes reproducteurs), il est donc logique que les teneurs en phospholipides, constituants de base des membranes cellulaires, restent à peu près constantes.

A la différence des phospholipides, les teneurs en CE et en TG varient considérablement durant cette période. Ainsi, les teneurs en CE diminuent pendant l'hiver avec la maturation sexuelle (de 423,3 en décembre à 257,8 ng/ind. en mars), puis celles-ci sont plus élevées au mois d'avril (446,1 ng/ind.), période à laquelle débutent l'accouplement et la ponte des œufs. A partir du mois d'avril, les teneurs en cérides ne cessent de chuter, elles atteignent 143,4 ng/ind. en juin.

Les teneurs en triglycérides suivent la tendance inverse à celle des cérides ; en effet, leurs concentrations, faibles en hiver (49,7 ng/ind. en décembre), augmentent au début du printemps (400,7 ng/ind. en mars), puis elles chutent en avril et mai (respectivement 53,7 et 33,0 ng/ind.) et enfin les TG sont accumulés par les femelles à partir du mois de mai.

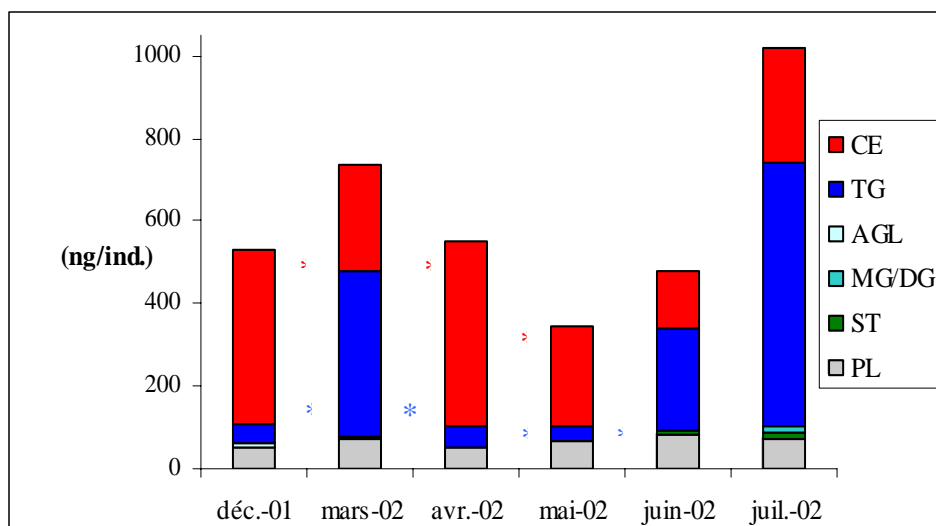


Figure V 6 : Variations des teneurs (en ng/ind.) des principales classes de lipides des femelles de la première génération.

CE : cérides ; TG : triglycérides ; AGL : acides gras libres ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; ST : stérols ; PL : phospholipides.

* : différence significative entre les teneurs d'une classe de lipides obtenues à deux dates consécutives (ANOVA, $P < 0,05$).

b. Conclusion

L'analyse des compositions lipidiques des femelles entre décembre et juillet 2002 montre que les lipides, et en particulier les lipides de réserve, jouent un rôle important dans la reproduction de *Mixodiaptomus*. Dans ce contexte, il est nécessaire de rappeler brièvement les mécanismes physiologiques entrant en jeu en période de reproduction chez les femelles de calanoïdes, mécanismes qui ont été étudiés par Rey et al. (1999) chez *Calanus finmarchicus* : avec le passage des CV en femelles adultes débute la maturation des gonades qui dure environ 8 jours à 5°C ; un jour après la métamorphose, les femelles sont fertilisées par les mâles (attachement du spermatophore). Le spermatophore est perdu par les femelles au bout de 2 jours à 5°C ; la première ponte a lieu environ une semaine après la fertilisation, et l'éclosion des œufs se fait environ 15 jours après la fertilisation des femelles. Pour *Mixodiaptomus laciniatus* du lac de La Godivelle-d'en-Haut, nous avons observé (chapitre III) qu'en mars les femelles étaient représentées par le stade CV, puis le stade adulte portant les œufs (femelles ovigères) en avril ; en mai, nous avons également noté la présence de femelles ovigères mais en proportions moindres qu'en avril. De plus, les femelles passent la saison hivernale (décembre à mars) sous forme de stade CV. Dans ce contexte, il est fort possible que la maturation sexuelle débute au mois de mars et se termine en avril, période à laquelle 64% des femelles portent des œufs (chapitre III, Tab. III 3).

En milieu polaire où le métabolisme lipidique des calanoïdes a été largement étudié, la majorité des auteurs considèrent que les espèces omnivores, capables de se nourrir toute l'année même quand la production primaire est très faible, passent l'hiver sous forme active ; elles ne diapausent pas, à l'inverse des espèces herbivores (McLaren & Corkett, 1978) ; ces copépodes omnivores conservent alors pendant la saison hivernale les réserves lipidiques accumulées auparavant afin de les mobiliser en tant que source d'énergie pour la reproduction (Hagen & Kattner, 1998). Chez *Mixodiaptomus*, entre décembre et mars, nous n'avons pas

observé de diminution notable des teneurs en lipides totaux et en lipides de réserve (CE + TG) ; de plus, les stades CV présentaient d'importantes quantités de TG. Il est donc fort possible que les copépodites V se nourrissent pendant cette période de façon omnivore, étant donné les conditions de faible production primaire rencontrées dans le milieu (chapitre IV).

En mars, avec le début de la maturation sexuelle, les teneurs en CE diminuent parallèlement à l'augmentation des ST. A ce sujet, les études concernant le rôle des lipides de réserve dans la reproduction suggèrent que l'énergie accumulée sous forme de CE par les femelles de calanoïdes est en partie utilisée pour la formation des gonades (Gatten et al., 1980). De plus, il semblerait que les ST, et en particulier le cholestérol, en complément de leur rôle en tant que précurseurs des hormones de mue, jouent également un rôle dans la reproduction et la maturation des gonades chez les crevettes pénaéïdes et qu'ils soient accumulés en quantités importantes dans les ovaires de ces crustacés (Kanazawa et al., 1988). Il est donc fort possible qu'ici ces deux types de composés (CE et ST) soient mobilisés lors de la maturation sexuelle de *Mixodiaptomus*.

En avril et mai ont lieu la reproduction proprement dite (accouplement) et la ponte des œufs. Cette période est marquée par une diminution des teneurs en lipides totaux principalement liée à la baisse des TG ; de plus, les teneurs en CE varient considérablement durant cette période ; elle sont élevées en avril chez les femelles ovigères (œufs compris lors de l'analyse des femelles), et plus faibles en mai lors la libération des œufs dans le milieu. Il est probable que ces deux classes de lipides de réserve soient mobilisées pendant cette phase. En effet, selon Gatten et al. (1980), Kattner & Krause (1987) et Tande & Henderson (1988), une importante diminution des teneurs en lipides totaux liée à celle des lipides de réserve chez les femelles de *Calanus* est constatée lorsque celles-ci produisent les œufs ; ces auteurs suggèrent que les femelles de calanoïdes transfèrent les lipides de réserve aux œufs afin de leur fournir l'énergie nécessaire au développement embryonnaire et post-embryonnaire, et considèrent par

conséquent qu'il y a un investissement maternel en lipides chez ces crustacés. Etant donné les fortes variations en lipides totaux et en lipides de réserve pendant cette phase de reproduction chez les femelles de *Mixodiptomus*, il est fort probable qu'il y ait un investissement maternel du même type chez cette espèce.

2. Composition lipidique des mâles reproducteurs

a. Teneurs en lipides totaux et des principales classes de lipides

De la même manière que chez les femelles reproductrices, les lipides des mâles en période de reproduction sont essentiellement représentés par les TG, les CE et les PL (Fig. V 7) ; cependant, à la différence de ce qui a été observé chez les femelles, les lipides de réserve des mâles sont principalement représentés par les TG.

Les teneurs en lipides totaux sont très variables pendant la période d'étude : elles sont relativement élevées en décembre (1344,4 ng/ind.), augmentent significativement en mars (1770,3 ng/ind., ANOVA à un facteur, $P < 0,05$), puis elles ne cessent de diminuer du mois d'avril (1422,9 ng/ind.) jusqu'au mois de juillet où elles atteignent 382,2 ng/ind. Les teneurs en phospholipides restent relativement stables pendant la période d'étude, une augmentation significative des valeurs ayant été enregistrée entre décembre et mars (de 50,5 à 88,1 ng/ind.). A l'inverse, les teneurs des deux principales classes de lipides de réserve, les CE et les TG, sont très variables pendant cette période. Les TG, sont présents à des valeurs relativement élevées de décembre à avril (entre 1770,3 et 1422,9 ng/ind.), puis celles-ci diminuent à partir du mois de mai pour atteindre une teneur minimale de 163,4 ng/ind. en juillet. Les teneurs en CE sont peu élevées pendant toute la période d'étude, des teneurs significativement plus importantes ayant été observées en mars.

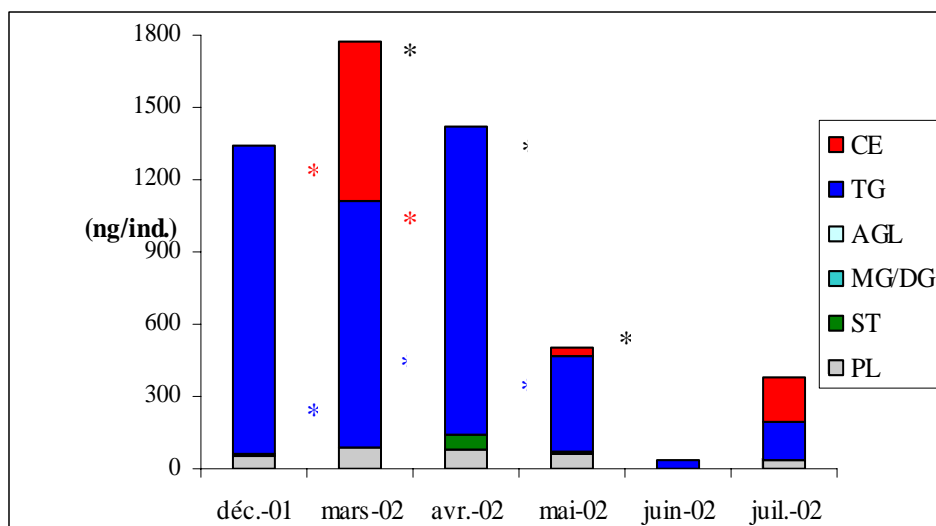


Figure V 7 : Variations des teneurs (en ng/ind.) des principales classes de lipides des mâles de la première génération.

CE : cérides ; TG : triglycérides ; AGL : acides gras libres ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; ST : stérols ; PL : phospholipides.

* : différence significative entre les teneurs en lipides totaux ou d'une classe de lipides obtenues à deux dates consécutives (ANOVA, $P < 0,05$).

b. Conclusion

A la différence des femelles, peu de lipides de réserve sont utilisés lors de la maturation sexuelle chez les mâles (mars). En effet, nous n'avons observé aucune baisse significative des teneurs en CE ou en TG entre mars et avril. Une observation similaire a été faite précédemment en milieu polaire chez *Calanus helgolandicus* par Gatten et al. (1980). Ces auteurs ont alors suggéré que le coût énergétique nécessaire à la formation des organes reproducteurs mâles est très faible, ce qui pourrait expliquer une absence de diminution des réserves lipidiques chez les stades CV de *Mixodiaptomus* en mars.

Nous avons cependant noté une importante réduction des lipides de réserve, et par conséquent des lipides totaux, à partir du mois d'avril. En effet, c'est probablement à cette période qu'a lieu la reproduction proprement dite chez *Mixodiaptomus*. Un phénomène similaire a été observé chez *Calanus finmarchicus* par Hopkins et al. (1984), espèce chez laquelle une forte diminution des réserves lipidiques a lieu chez les mâles lors de l'accouplement et de l'attachement du spermatophore ; ces auteurs en concluent que les lipides de réserve sont utilisés pour soutenir le coût énergétique relatif à l'accouplement des calanoïdes. Après la phase de reproduction (avril – mai), il semblerait que les réserves lipidiques ne se reconstituent pas chez les mâles (Fig. V 7).

3. Conclusion

Nos résultats tendent à montrer le rôle prépondérant des lipides de réserve, à savoir les TG et les CE, mais aussi des ST, dans les mécanismes reproductifs de *Mixodiaptomus laciniatus*. Ainsi, les CE, les TG et les ST permettraient d'assurer la maturation sexuelle des femelles ainsi que la ponte des œufs à une période de l'année où les ressources nutritives (MOP totale) sont très faibles dans le milieu (chapitre IV). Même si les femelles de *Mixodiaptomus* peuvent probablement se nourrir toute l'année, il est peu vraisemblable que

les seules ressources nutritives qu'elles puisent dans le milieu à cette période de l'année leur permettent d'assurer complètement la reproduction. Dans ce contexte, l'intense accumulation de réserves lipidiques lors du bloom phytoplanctonique de l'année précédente s'avère très importante pour assurer le cycle biologique de *Mixodiaptomus*. Ce mécanisme est fréquent chez de nombreux copépodes calanoïdes vivant dans des écosystèmes aquatiques peu productifs (Hagen & Kattner, 1998). Il faut également noter que l'investissement maternel en lipides (Gatten et al., 1980) doit jouer un rôle primordial dans le développement larvaire, car il est généralement reconnu que les premiers stades nauplii ne se nourrissent pas (Tande & Henderson, 1988), ce qui implique donc que les réserves énergétiques accumulées par les femelles dans les œufs sont essentielles à la croissance larvaire. Pour les mâles de *Mixodiaptomus*, la diminution des réserves énergétiques semble moins liée à la maturation des gonades qu'à l'activité de reproduction, conformément à ce qui est observé chez les copépodes marins (Gatten et al., 1980 ; Hopkins et al., 1984).

La stratégie d'accumulation des lipides chez *Mixodiaptomus* semble être différente selon les sexes. En effet, nous avons noté des teneurs en lipides totaux en moyenne de 586,8 ng/ind. chez les femelles et de 1084,2 ng/ind. chez les mâles. Or, des études antérieures comparant les teneurs en lipides des deux sexes chez les calanoïdes ne semblent pas avoir mis en évidence de différences notables (Kattner et al., 1994 ; Vanderploeg et al., 1998). En fait, les mâles de *Mixodiaptomus* accumulent d'importantes quantités de TG, alors que les teneurs en ces composés chez les femelles sont considérablement plus faibles, ce qui explique les différences apparentes dans les teneurs en lipides totaux observées entre les deux sexes. Etant donné que l'accumulation de TG chez les copépodes est la résultante d'une importante activité nutritive (Scott et al., 2002), il est alors possible que le comportement alimentaire de *Mixodiaptomus* soit différent selon les sexes, en particulier en période de reproduction.

B. Métabolisme lipidique et développement larvaire

1. Teneurs en lipides totaux et des principales classes de lipides

Les teneurs en lipides totaux augmentent globalement avec la croissance larvaire (Fig. V 8 et 9). Toutefois, les stades NI présentent 227,3 ng/ind. de LT alors que ces valeurs diminuent significativement avec le passage des larves aux stades NII-NIII (126,9 ng/ind.). Mis à part cette diminution, les teneurs en lipides totaux augmentent significativement avec la croissance larvaire sauf entre juin et juillet. De manière identique à ce qui a été observé chez la première génération de *M. laciniatus*, les femelles contiennent moins de lipides totaux que les mâles (différence significative entre les deux sexes en novembre).

Comme chez les adultes reproducteurs, les principales classes de lipides des individus de la seconde génération sont les CE, les TG et les PL. Ainsi, les teneurs en phospholipides augmentent progressivement avec la croissance des larves (Fig. V 8 et 9).

Concernant les variations des teneurs en CE et en TG, il existe une différence très importante entre les stades NI à CIII-CIV et les derniers stades copépodites CV-Ad. très probablement liée à la croissance corporelle du calanoïde. En ce qui concerne les variations des teneurs individuelles en CE (Fig. V 8), nous avons observé une diminution significative entre avril et mai (de 175,1 à 77,5 ng/ind.), puis une augmentation significative entre les stades NII-NIII et les CII (212,5 ng/ind. de CE chez les CII), une diminution chez les CIV (143,8 ng/ind.), puis une augmentation des teneurs en CE chez les derniers stades copépodites.

Les teneurs en TG (Fig. V 8 et 9) sont relativement faibles et stables jusqu'au mois de juillet, elles sont comprises entre 27,2 et 45,3 ng/ind. durant cette période, puis ces valeurs augmentent significativement chez les deux sexes en septembre (75,8 ng/ind. chez les femelles, 205,1 ng/ind. chez les mâles), et seulement chez les mâles en novembre (1308,1 ng/ind.).

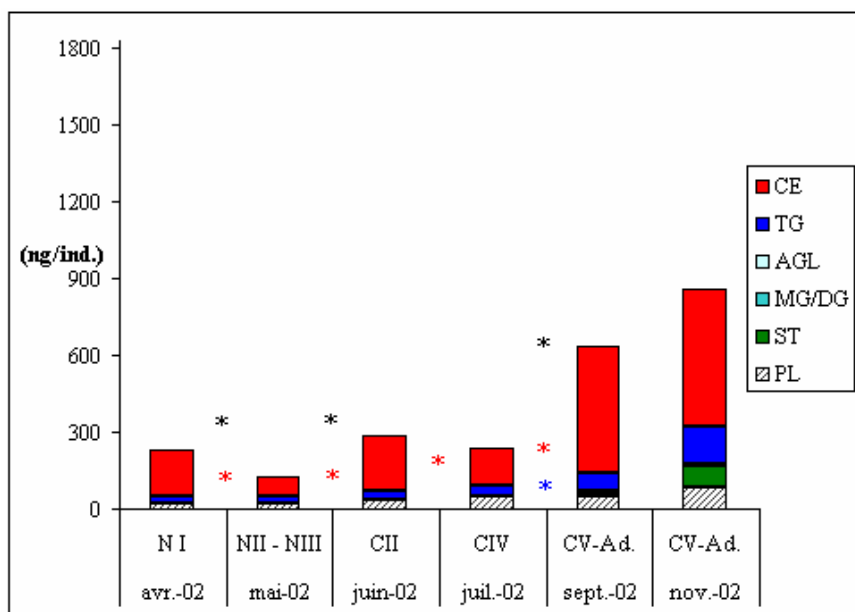


Figure V 8 : Variations des teneurs (en ng/ind.) des principales classes de lipides des femelles de la seconde génération.

CE : cérides ; TG : triglycérides ; AGL : acides gras libres ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; ST : stérols ; PL : phospholipides.

* : différence significative entre les teneurs en lipides totaux ou d'une classe de lipides obtenues à deux dates consécutives (ANOVA, $P < 0,05$).

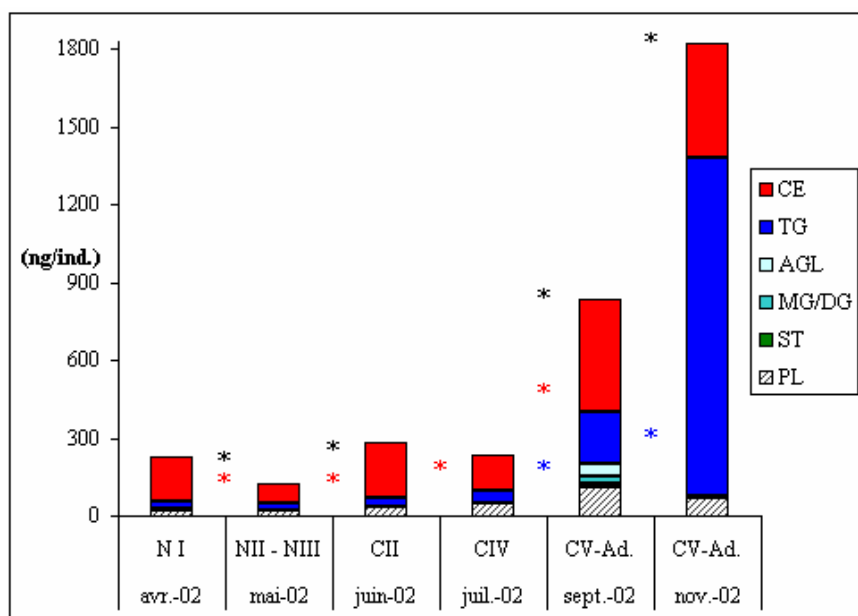


Figure V 9 : Variations des teneurs (en ng/ind.) des principales classes de lipides des mâles de la seconde génération.

CE : cérides ; TG : triglycérides ; AGL : acides gras libres ; MG : monoglycérides ; DG : diglycérides ; ST : stérols ; PL : phospholipides.

* : différence significative entre les teneurs en lipides totaux ou d'une classe de lipides obtenues à deux dates consécutives (ANOVA, $P < 0,05$).

2. Conclusion

L'analyse des teneurs en lipides de la seconde génération souligne l'importance de ces composés dans la réalisation du cycle biologique de *Mixodiaptomus*. En effet, nous avons observé que les premiers stades nauplii (NI d'avril) étaient plus riches en lipides totaux, et en particulier en cérides, que les stades NII-NIII récoltés au mois de mai. Ce phénomène, souvent observé chez les copépodes calanoïdes, est interprété comme la conséquence de l'investissement maternel en lipides (Gatten et al., 1980) : ainsi, les importantes quantités de lipides de réserve déposées par les femelles dans les œufs seraient utilisées par les premiers stades larvaires pour assurer leur croissance (Lee et al., 1972, 1974). La présence d'une grande quantité de CE chez les jeunes larves est liée à une incapacité à se nourrir décrite chez plusieurs espèces (Tande & Henderson, 1988) ; à l'inverse, chez d'autres espèces dont les œufs sont pauvres en CE, les larves débutent précocement la prise de nourriture et seraient donc plus dépendantes de la production phytoplanctonique (Lee et al., 1972). Chez *Mixodiaptomus*, l'investissement maternel en lipides permettrait ainsi d'assurer le développement et la croissance des jeunes stades, ceux-ci utilisant alors leurs propres réserves lipidiques au moment où la production primaire printanière est relativement faible (chapitre IV).

Entre mai et juin, lorsque les juvéniles atteignent le stade CII, les teneurs en LT et en lipides de réserve, en particulier celles des CE, augmentent ; cette élévation est probablement liée à l'alimentation de ces stades. Toutefois, les LT et les réserves lipidiques restent relativement peu élevées chez les premiers stades copépodites par rapport aux autres stades. Ainsi, ces copépodites CI-CII n'utiliseraient pas l'énergie d'origine alimentaire pour constituer des réserves lipidiques, mais l'investiraient immédiatement pour un développement et une croissance rapide afin d'atteindre le plus tôt possible un stade capable de survivre pendant la saison hivernale (Kattner et al., 1994).

Enfin, chez les derniers stades copépodites (CV et Ad.), l'accroissement des teneurs en LT, CE et TG est maximal. La reconstitution des réserves lipidiques a principalement lieu en septembre et novembre, pendant le bloom phytoplanctonique automnal (chapitre IV). Cette tendance est généralement rencontrée chez les copépodes calanoïdes polaires (Lee et al., 1972, 1974 ; Kattner et al., 1994), chez lesquels le stockage de lipides a principalement lieu chez les stades les plus âgés (CIII à Ad. selon les espèces). Les importantes quantités de lipides de réserve accumulées par ces stades permettraient leur survie en saison hivernale et le soutien de la reproduction au printemps suivant (Sargent & Falk-Pertersen, 1988).

III. Conclusion

Mixodiaptomus laciniatus accumule d'importantes réserves lipidiques lui permettant d'assurer son cycle biologique. Les teneurs en lipides totaux que nous avons observées chez ce copépode sont du même ordre de grandeur que celles relevées chez d'autres espèces marines de copépodes calanoïdes ou d'euphausiacées (Ju & Harvey, 2004), mais elles ne sont pas aussi élevées que celles enregistrées chez certains calanoïdes polaires dont les concentrations en lipides totaux peuvent atteindre jusqu'à 70% du poids sec (Albers et al., 1996) ; de plus, les quelques études consacrées aux lipides des calanoïdes lacustres relatent des teneurs en lipides totaux chez les adultes comprises entre 9,7 et 60% du poids sec (Cavaletto et al., 1989 ; Arts et al., 1993 ; Vanderploeg et al., 1998). Toutefois, ces données bibliographiques sont limitées car la plupart des études en milieu marin ou lacustre se sont concentrées sur les adultes, et souvent uniquement sur les femelles ; également, l'analyse des teneurs en lipides totaux ou des compositions lipidiques sont souvent limitées à une ou deux saisons (Cavaletto et al., 1989 ; Arts et al., 1993 ; Vanderploeg et al., 1998). Dans ce contexte,

il nous est difficile de comparer nos résultats avec ceux obtenus pour d'autres calanoïdes lacustres.

Enfin, il s'avère important de noter que *Mixodiaptomus laciniatus* accumule les plus grandes quantités de réserves énergétiques (CE et TG) en septembre et novembre, au moment où la population atteint le dernier stade copépodite (CV et Ad.). A cette période, nous avons relevé les proportions en AGPI de la série (n-3) les plus élevées dans les GL, les CE et les PL, en particulier en 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3) et 22:6(n-3), ainsi que les plus fortes concentrations en ST totaux. Ce stockage maximal de lipides et d'AGPI de la série (n-3) est concomitant avec le bloom phytoplanctonique automnal (chapitre IV). De plus, nous avons observé que les derniers stades copépodites semblaient ingérer préférentiellement des chlorophycées et des flagellés autotrophes à cette époque de l'année, ces microorganismes étant pratiquement les seules sources d'AGPI de la série (n-3) et de stérols pour le zooplancton dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut. L'ingestion en automne de ces microalgues, dont la qualité nutritionnelle est relativement élevée comparativement aux autres composantes de la biomasse microbienne du lac, permet donc très probablement aux derniers stades copépodites d'accumuler d'importantes réserves lipidiques. Ces réserves serviront par la suite à la survie pendant la saison hivernale et également à la réalisation de la reproduction printanière suivante.

CHAPITRE VI :
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Le lac de La Godivelle-d'en-Haut est un lac de montagne (altitude : 1239m) situé dans le Massif Central français. A la différence d'écosystèmes lacustres localisés à une altitude similaire et géographiquement proches comme les lacs Pavin et Servières, ce milieu est caractérisé par son statut très oligotrophe, mais surtout par des températures basses toute l'année (chapitre III). Ces conditions pourraient expliquer le fait que les cladocères et les copépodes cyclopoïdes, très bien représentés dans les lacs Pavin et Servières (Véra, 2001), ne se développent dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut que durant une période courte de l'année (chapitre III). Le copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus* est la seule espèce de microcrustacé zooplanctonique présente à des densités élevées dans ce milieu. Contrairement aux cladocères et aux cyclopoïdes qui, durant une grande partie de l'année, diapaudent ou survivent sous la forme d'œufs de durée, *M. laciniatus* est présent de façon permanente dans le milieu. Ce calanoïde constitue donc dans cet écosystème une composante très importante du réseau trophique. Ces diverses observations nous ont par conséquent conduit à nous intéresser aux stratégies adaptatives mises en œuvre par *Mixodiaptomus* pour assurer sa pérennité dans ce milieu.

Dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, le cycle de développement de *Mixodiaptomus laciniatus* est marqué par une reproduction de la population immédiatement après le dégel printanier. La génération issue de cette reproduction se développe du début du printemps (NI) jusqu'à l'automne, et passe l'hiver sous la forme des derniers stades copépodites (CV-Ad.). *M. laciniatus* réalise donc dans cet écosystème un cycle biologique univoltin. Ce type de cycle est généralement rencontré chez les calanoïdes vivant dans les lacs d'altitude et dans les mers polaires (Rey & Capblancq, 1975 ; Albers et al., 1996). Dans la plupart des écosystèmes de montagne où *Mixodiaptomus laciniatus* est rencontré, il réalise un tel cycle de vie (Rey & Capblancq, 1975 ; Cruz-Pizarro, 1983 ; Carrillo et al., 2001 ; Villar-Argaiz et al., 2002). Les lacs de montagne et les mers polaires sont caractérisés par une période de bloom

phytoplanctonique très courte ainsi que par une longue phase de gel hivernal. Pour faire face à de telles conditions, les calanoïdes réalisent un cycle univoltin (Kattner & Hagen, 1995). Par ailleurs, la faible quantité de nourriture disponible dans le milieu nécessite de la part de ces copépodes d'accumuler d'importantes réserves énergétiques (Sargent & Falk-Petersen, 1988). Celles-ci sont essentiellement représentées par des lipides dont les deux principales formes de stockage sont les TG et les CE (Sargent & Falk-Petersen, 1988 ; Kattner et al., 1994). Il faut toutefois noter que cette espèce peut également effectuer un cycle bivoltin lorsque des conditions du milieu plus favorables le permettent (Medina-Sánchez et al., 1999).

Au cours de cette étude, nous avons choisi de suivre l'évolution des réserves lipidiques de *Mixodiaptomus laciniatus* au cours de son cycle biologique. Nos résultats ont montré que les adultes du copépode présentent, au début du printemps, des teneurs élevées en lipides de réserve (chapitre V) ; celles-ci sont constituées majoritairement de CE chez les femelles et de TG chez les mâles. Compte tenu des conditions de limitation nutritive du milieu lorsque *M. laciniatus* se reproduit (chapitre IV), il est possible que la nourriture ingérée par celui-ci ne soit pas suffisante en quantité et en qualité pour soutenir complètement la maturation sexuelle et la reproduction du copépode ; les quantités importantes de TG et de CE présentes chez *Mixodiaptomus* permettraient alors de fournir l'énergie nécessaire au déroulement de cette phase du cycle biologique. A cet égard, les travaux réalisés en milieu marin laissent supposer que les lipides permettent chez les femelles la maturation des gonades et la production ovigère (Gatten et al., 1980 ; Kattner & Krause, 1987 ; Tande & Henderson, 1988). Nos résultats montrent que les réserves lipidiques chutent fortement chez les mâles et les femelles durant la reproduction, avec toutefois une différence importante observée entre les deux sexes. En effet, les CE sont rapidement mobilisés chez les mâles, alors qu'ils diminuent de façon plus progressive et sur une période plus longue chez les femelles. Ces dissemblances pourraient être liées à une utilisation différente des réserves énergétiques selon le sexe. Des études

antérieures suggèrent que les TG et les CE fournissent chez les mâles de calanoïdes marins l'énergie nécessaire à l'accouplement et à l'attachement du spermatophore (Gatten et al., 1980 ; Hopkins et al., 1984). A la différence des mâles, les femelles déposeraient des quantités non négligeables de lipides de réserve sous la forme de TG ou de CE dans les œufs (Gatten et al., 1980 ; Kattner & Krause, 1987 ; Tande & Henderson, 1988). Ces lipides garantiraient le développement embryonnaire ainsi que la croissance des premiers stades larvaires incapables de se nourrir (Lee et al., 1972, 1974 ; Gatten et al., 1980 ; Tande & Henderson, 1988). En accord avec cette hypothèse, nos résultats montrent que les larves NI présentent une composition lipidique très proche de celle des femelles ovigères et caractérisée par des quantités importantes de CE (chapitre V). Nous avons également observé que ces réserves tendent à diminuer chez les stades de développement suivants, suggérant leur utilisation par les jeunes stades de *Mixodiaptomus*. Enfin, les teneurs en CE et en TG restent relativement basses pendant la majorité du développement et ne s'accroissent réellement qu'à l'apparition des derniers stades copépodites. En effet, ce sont les stades CV-Ad. se développant en automne qui présentent les teneurs les plus élevées en lipides, ceux-ci accumulant des quantités importantes de TG et de CE. Cette tendance est typique des calanoïdes, chez qui l'accumulation de lipides de réserve est généralement maximale entre les stades CIII et Ad. (Kattner & Krause, 1987) ; il faut toutefois noter que les stades de développement capables d'une telle accumulation sont variables d'une espèce à l'autre (Lee et al., 1972, 1974 ; Kattner et al., 1994). Ces réserves lipidiques stockées par les copépodites les plus âgés de *Mixodiaptomus* assureront probablement la survie de la population pendant la saison hivernale mais également la prochaine reproduction. Cependant, il semble que cette importante accumulation de lipides n'est rendue possible que par une plus grande disponibilité de la nourriture au moment où les derniers stades copépodites apparaissent. En effet, l'apparition des stades CV-Ad. est concomitante au bloom phytoplanctonique automnal

(chapitre III). L'ensemble de nos résultats concernant les réserves lipidiques de *M. laciniatus* et son cycle biologique tendent par conséquent à montrer que la stratégie mise en œuvre par celui-ci est de se reproduire en condition de limitation nutritive dans le milieu, grâce à des réserves lipidiques intrinsèques accumulées au cours du bloom phytoplanctonique précédent. Cette reproduction s'effectue de manière à ce que le développement des derniers stades copépodites de la génération suivante coïncide avec le prochain bloom phytoplanctonique ; ceux-ci peuvent par conséquent accumuler des quantités importantes de lipides de réserve. Une stratégie similaire a été décrite en mer polaire chez *Calanus finmarchicus* (Irigoien, 2004). Cependant, à la différence de *M. laciniatus*, l'accumulation de lipides de réserve chez cette espèce est maximale chez les stades CIII à CV (Hygum et al., 2000). Notre étude ne nous a cependant permis de suivre la croissance que d'une seule génération, laquelle a bénéficié de la période de plus forte production primaire alors qu'elle était au stade CV-Ad.. On ne peut donc pas conclure que, dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, l'accumulation des lipides de réserve chez *Mixodiaptomus* est maximale uniquement chez les stades CV à Ad.. Il serait par conséquent nécessaire de confirmer nos résultats en réalisant un suivi pluriannuel. En dépit de cette difficulté, il apparaît que le cycle biologique et l'accumulation de réserves lipidiques chez la population de *M. laciniatus* que nous avons pu suivre sont très similaires à ceux de *Calanus finmarchicus*. En effet, cette espèce marine polaire qui a fait l'objet de nombreux travaux, se reproduit toujours plusieurs mois avant la période de plus forte production primaire (Niehoff et al., 1999 ; Richardson et al., 1999). Les réserves lipidiques accumulées au cours du bloom phytoplanctonique précédent assureraient alors la reproduction du calanoïde en condition de faible quantité de nourriture dans le milieu. De plus, le temps nécessaire au développement embryonnaire et larvaire de cette espèce est long, de l'ordre de plusieurs mois (Corkett et al., 1986). Ainsi, si la reproduction avait lieu juste avant ou pendant la période de plus forte production primaire, le bloom phytoplanctonique serait trop court

pour que les derniers stades copépodites se développent pendant celui-ci ; dans ce contexte, ceux-ci seraient incapables d'accumuler des quantités suffisantes de réserves lipidiques pour survivre pendant l'hiver et se reproduire l'année suivante ; la population serait donc vouée à l'échec (Irigoién, 2004).

Au vu de l'ensemble des travaux concernant *Calanus finmarchicus* et de nos propres résultats, il semblerait par conséquent que la population de *M. laciniatus* du lac de La Godivelle-d'en-Haut et l'espèce polaire *C. finmarchicus* présentent des stratégies similaires de déroulement de leur cycle biologique et de mise en réserve des lipides. Etant donné que l'accumulation de réserves lipidiques est fortement dépendante de la disponibilité en nourriture du milieu, il a donc été nécessaire de définir l'environnement trophique potentiel de *M. laciniatus*, et de préciser son régime alimentaire au cours de son cycle de développement. La biomasse microbienne présente dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut est largement dominée par le picoplancton (bactéries hétérotrophes, picocyanobactéries, picochlorophycées). D'autres microorganismes tels que les HNF, les cryptophycées et les chlorophycées constituent également une part importante de la MOP. Ces différents groupes taxonomiques ont été caractérisés à l'aide de un ou plusieurs marqueurs chémotaxonomiques de type pigment, AG ou ST dans le but principal de définir le régime alimentaire des différentes écophases de *Mixodiaptomus laciniatus*.

Dans un premier temps, l'analyse en conditions expérimentales des contenus pigmentaires du copépode nourri avec les principaux groupes phytoplanctoniques rencontrés dans le lac nous a permis de définir ses préférences alimentaires (chapitre V). Ces expériences de nutrition ont mis en évidence que les picocyanobactéries, à l'inverse des microalgues testées, ne sont pas ingérées par le copépode. De plus, ce dernier montre une sélectivité assez marquée et variable selon le stade de développement considéré. Ainsi, les jeunes larves semblent sélectionner fortement les chlorophycées, alors que les adultes préféreraient les diatomées ; à l'inverse, les

cryptophycées sont activement recherchées par tous les stades de développement du copépode. La taille des particules disponibles pourrait en partie expliquer les différences de comportement alimentaire observées chez *Mixodiaptomus*. Cependant, la plupart des microalgues proposées lors de cette étude ayant des tailles équivalentes, ce seul critère ne peut être à l'origine d'une telle sélectivité. Il est par conséquent logique de penser que d'autres mécanismes entrent en jeu. Bien que le comportement alimentaire des calanoïdes soit encore mal connu, il semble que des facteurs tels que le goût, la forme, la digestibilité, la mobilité, la toxicité, la composition élémentaire et biochimique de la proie, l'espèce et le stade de développement du copépode doivent être pris en compte (Fernandez, 1979 ; DeMott, 1986, 1988 ; Sykes & Huntley, 1987 ; Cowles et al., 1988 ; Sterner, 1990 ; Støttrup & Jensen, 1990 ; Hansen & Boeckel, 1991 ; Kerfoot & Kirk, 1991 ; DeMott & Watson, 1991 ; Malej & Harris, 1993 ; Santer, 1994 ; Hart & Santer, 1994 ; Kleppel et al., 1998a ; Gasparini et al., 2000 ; Von Elert & Stampfl, 2000). Nos résultats expérimentaux ne permettent cependant pas de préciser plus avant les mécanismes entrant en jeu dans la sélectivité alimentaire de *M. laciniatus*. *Mixodiaptomus* étant une composante majeure du réseau trophique planctonique du lac de la Godivelle-d'en-Haut, il est probable que ces mécanismes ont des conséquences importantes sur la dynamique des communautés microbiennes du lac.

Au cours de la seconde partie de notre étude, nous avons cherché à retrouver et à préciser en milieu naturel les préférences alimentaires de *Mixodiaptomus* mises en évidence en laboratoire (chapitre V), en utilisant simultanément les biomarqueurs de type pigments, AG et ST employés parallèlement pour caractériser la biomasse microbienne du lac (chapitre IV). Ainsi, la présence des composés caractéristiques des chlorophycées (chlorophylle *b*, lutéine, 18:3(n-3), campesterol, stigmastérol, β -sitostérol) et des cryptophycées (alloxanthine, 18:4(n-3) + 20:5(n-3) + 22:6(n-3)) chez le calanoïde montrent que ces deux groupes phytoplanctoniques constituent une part importante de la nourriture ingérée par

Mixodiaptomus, en particulier lors du bloom phytoplanctonique automnal. Les diatomées, malgré leur présence à des biomasses très faibles dans le milieu, semblent être sélectionnées activement en période estivale (chlorophylle *c₁*, trans-22-dehydrocholestérol). Conformément à nos résultats expérimentaux, et malgré leur prédominance en terme de biomasse dans le lac, les picocyanobactéries ne semblent pas être ingérées par le copépode, quelque soit le stade de développement considéré. Enfin, la détection d'AG en C15 et C17 chez le calanoïde suggère l'ingestion de ces organismes par *M. laciniatus* puisque ces composés sont caractéristiques des cellules procaryotes et des flagellés bactériovores. Cependant, les expériences de nutrition que nous avons menées en laboratoire ainsi que des études concernant d'autres calanoïdes (Johnson et al., 1982) laissent supposer que les picocyanobactéries ne seraient pas ingérées par *Mixodiaptomus*. Comme les marqueurs chémotaxonomiques que nous avons utilisés ne distinguent pas les bactéries hétérotrophes des protozoaires bactériovores, nous ne pouvons pas savoir si les AG en C15 et C17 détectés chez le copépode proviennent de l'un et/ou l'autre de ces organismes. A ce sujet, l'ingestion de bactéries hétérotrophes libres ou attachées à des particules par les calanoïdes a été montrée par plusieurs auteurs (Turner & Tester, 1992 ; Lawrence et al., 1993 ; Roff et al., 1995), mais celle-ci dépend largement de l'espèce de copépode considérée et de son stade de développement ; elle est en effet la conséquence de la morphologie des appendices buccaux de celui-ci (Pont, 1995). L'ingestion de flagellés hétérotrophes par les calanoïdes n'est plus à prouver et elle peut même être très importante dans de nombreux écosystèmes lacustres (Stoecker & Capuzzo, 1990 ; Verity & Paffenhöfer, 1996 ; Paffenhöfer, 1998). Ces organismes bactériovores, par leur broutage sur les procaryotes, rendent accessible aux microcrustacés zooplanctoniques la production picoplanctonique qui constitue, dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, la plus grande part de la production primaire totale. A ce sujet, il faut rappeler que les plus fortes proportions d'AG bactériens en C15 et C17 ont été détectées au printemps et en été chez *M. laciniatus*, périodes au cours desquelles

les plus faibles biomasses phytoplanctoniques ont été relevées. Ces résultats tendent à montrer que les flagellés hétérotrophes représentent une source de nourriture importante pour *Mixodiaptomus* lorsque les proies phytoplanctoniques sont peu abondantes dans le milieu. Il faut rappeler que les capacités de biosynthèse des ST sont généralement faibles ou nulles chez les microcrustacés (Kanazawa, 1984 ; Teshima, 1991), alors que ces composés ont une fonction essentielle dans leur cycle biologique car ce sont des précurseurs des hormones sexuelles et de mue chez les arthropodes (Laufer et al., 1993 ; Kanazawa, 2000). Ceux-ci doivent par conséquent les obtenir de leur nourriture. Etant donné que seuls les microorganismes eucaryotes sont capables de synthétiser ces composés, la principale source de ST pour *Mixodiaptomus* dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut est donc représentée par les microalgues car celles-ci constituent la plus grande part de la biomasse microbienne eucaryote dans ce milieu. Au printemps et en été, périodes durant lesquelles la biomasse des microalgues phytoplanctoniques est très faible, les flagellés hétérotrophes, dont les capacités de synthèse des ST sont connues (Harvey et al., 1997 ; Volkman, 2003), constitueraient pour *M. laciniatus* un apport non négligeable en ST.

D'autres composés jouent également un rôle important lors d'étapes importantes du cycle biologique des microcrustacés, notamment au cours de l'embryogénèse (Sargent & Henderson, 1986), de l'ontogénèse et de la reproduction (Middleditch et al., 1980 ; Lytle et al., 1990 ; Støttrup & Jensen, 1990 ; Xu et al., 1994 ; Hazzard & Kleppel, 2003). Ainsi, le rôle des AGPI, et en particulier du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) (Støttrup & Jensen, 1990 ; Xu et al., 1994 ; Kleppel et al., 1998a) a été souligné. Dans le lac de La Godivelle-d'en-Haut, la principale source alimentaire d'AGPI (n-3) pour *Mixodiaptomus* correspond aux chlorophycées, microalgues riches en 18:3(n-3). Il a été montré que plusieurs copépodes marins et lacustres peuvent obtenir du 20:5(n-3) et du 22:6(n-3) par élongations et désaturations du 18:3(n-3) d'origine alimentaire, et ce en quantités suffisantes pour subvenir à

leurs besoins métaboliques (Sargent & Henderson, 1986 ; Jónasdóttir, 1994 ; Norsker & Støttrup, 1994 ; Desvillettes et al., 1997b ; Kleppel et al., 1998a ; Nanton & Castell, 1998). Toutefois, ces capacités de biosynthèse semblent être très limitées chez plusieurs autres espèces de calanoïdes (Støttrup & Jensen, 1990). Notre étude ne nous permet cependant pas de déterminer si *M. laciniatus* est capable de synthétiser des AGPI à longue chaîne carbonée à partir du 18:3(n-3) d'origine alimentaire, d'autant qu'il exerce, à certaines périodes de l'année, une importante pression de prédation sur des microalgues autres que les chlorophycées et riches en 20:5(n-3) et en 22:6(n-3). En effet, nos travaux expérimentaux et en milieu naturel soulignent le fait que *Mixodiaptomus* consomme activement les diatomées et les cryptophycées en dépit de leur faible densité dans le milieu ; or, ces microalgues sont caractérisées par des teneurs élevées en ces deux AGPI. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de formuler des hypothèses vis-à-vis des réelles capacités biosynthétiques de *M. laciniatus*. A l'avenir, celles-ci pourraient être étudiées par la méthode de supplémentation de composé individuel récemment mise au point par Von Elert (2002) ; cette technique nous permettrait également de mieux comprendre le métabolisme de ces deux AGPI, d'autant que chacun semble jouer un rôle physiologique précis chez les copépodes. Selon Xu et al. (1994), le 20:5(n-3) serait plutôt impliqué dans le développement ovarien, tandis que le 22:6(n-3) serait nécessaire au déroulement de l'embryogénèse. Compte tenu de leur implication dans les mécanismes de la reproduction, et notamment celle du 20:5(n-3) dans le développement ovarien des femelles, il est fort probable que ces composés agissent différemment chez les mâles et les femelles. Notre étude a également souligné une accumulation différente des réserves lipidiques selon le sexe des individus des deux générations étudiées. Ainsi, les mâles stockent plus de lipides que les femelles (en novembre : 1851 ng/ind. chez les mâles, 680 ng/ind. chez les femelles) ; ceci est principalement lié à une accumulation de quantités importantes de TG chez les mâles uniquement. Ces différences

entre sexes pourraient être attribuées à des comportements différents conformément à ce qu'ont observé plusieurs auteurs. Ainsi, par exemple, Nicholls (1933) avait déjà montré que chez les adultes de *Calanus finmarchicus* de la mer Clyde, les migrations nycthémerales ont une amplitude beaucoup plus importante chez les femelles que chez les mâles, alors que Schabetsberger & Jersabek (2004) notent la tendance inverse chez le calanoïde lacustre *Arctodiaptomus alpinus*. En étudiant le comportement natatoire du cyclopoïde *Oithona davis*, Uchima & Hirano (1988) suggèrent que les mâles se déplacent principalement dans le but de trouver un partenaire sexuel, alors que les femelles recherchent les endroits les moins peuplés et les plus riches en nourriture. Le comportement de *Mixodiaptomus laciniatus* est à notre connaissance très peu connu. Par analogie aux espèces citées précédemment, on peut cependant envisager que le mode de vie des copépodes, différent selon le sexe, a une incidence sur les dépenses énergétiques, et donc sur les réserves lipidiques des individus, qu'il serait nécessaire de préciser.

Au terme de ce travail, l'étude des réserves lipidiques au cours du cycle biologique de *Mixodiaptomus laciniatus* ainsi que le suivi des biomarqueurs lipidiques et pigmentaires pour analyser les relations trophiques existant entre les communautés microbiennes et ce calanoïde suggèrent que ce microcrustacé a mis en place un ensemble de stratégies à la fois écologiques, physiologiques, biochimiques et probablement comportementales lui permettant de se développer dans un lac de montagne caractérisé par des conditions abiotiques et biotiques contraignantes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOU DEBS, C. & NIVAL, P. (1983).** Etude de la ponte et du développement embryonnaire en relation avec la température et la nourriture chez *Temora stylifera* Dana (Copepoda: Calanoida). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 72, 125-145.
- ACKMAN, R.G., TOCHER, C.S. & Mc LAHAN, J. (1968).** Marine phytoplankter fatty acids. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 25, 1603-1620.
- AHLGREN, G., LUNDSTEDT, L., BRETT, M. & FORSBERG, C. (1990).** Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J. Plankton Res.*, 12, 809-818.
- AHLGREN, G., GUSTAFSSON, I. & BOBERG, M. (1992).** Fatty acid and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.*, 28, 37-50.
- AHLGREN, G., GOEDCOOP, W., MARKENSTEN, H., SONESTEN, L. & BOBERG, M. (1997).** Seasonal variations in food quality for pelagic and benthic invertebrates in Lake Erken - the role of fatty acids. *Freshwat. Biol.*, 38, 555-570.
- ALBERS, C.S., KATTNER, G. & HAGEN, W. (1996).** The compositions of wax esters, triacylglycerols and phospholipids in Arctic and Antarctic copepods : evidence of energetic adaptations. *Mar. Chem.*, 55, 347-358.
- ANDERSEN, R.A., BIDIGARE, R.R., KELLER, M.D. & LATASA, M. (1996).** A comparison of HPLC pigment signatures and electron microscopic observations for oligotrophic waters of the North Atlantic and Pacific Oceans. *Deep Sea Res. II*, 43(2-3), 517-537.
- ARTS, M.T., ROBARTS, R.D. & EVANS, M.S. (1993).** Energy reserve lipids of zooplanktonic crustaceans from an oligotrophic saline lake in relation to food resources and temperature. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50, 2404-2420.

- BÅMSTEDT, U. & TANDE, K. (1988).** Physiological responses of *Calanus finmarchicus* and *Metridia longa* (Copepoda : Calanoida) during the winter-spring transition. *Mar. Biol.*, 99, 31-38.
- BARRETT, J. & JEFFREY, S.W. (1964).** Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae. *Plant Physiol.*, 39, 44-47.
- BAUTISTA, B. & HARRIS, R.P. (1992).** Copepod gut content, ingestion rates and grazing impact on phytoplankton in relation to size structure of zooplankton and phytoplankton during a spring bloom. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 82, 41-50.
- BEC, A. (2003).** Flux de matière dans le réseau trophique planctonique du lac d'Annecy : Approche expérimentale et *in situ* par les acides gras marqueurs et leurs rapports isotopiques ($\delta^{13}\text{C}$). *Thèse de doctorat de l'Université de Savoie*, 216p.
- BEC, A., DESVILETTES, C., VERA, A., LEMARCHAND, C., FONTVIELLE, D. & BOURDIER, G. (2003a).** Nutritional quality of a freshwater heterotrophic flagellate : trophic upgrading of its microalgal diet for *Daphnia*. *Aquat. Microb. Ecol.*, 32, 203-207.
- BEC, A., DESVILETTES, C., VERA, A., FONTVIELLE, D. & BOURDIER, G. (2003b).** Nutritional value of different food sources for the benthic daphnidae *Simocephalus vetulus*: role of fatty acids. *Arch. Hydrobiol.*, 156, 145-163.
- BEGHIN, V. (1999).** Etude de la matière organique et du réseau trophique en estuaire de Seine ; utilisation des marqueurs biogéochimiques (acides gras et stérols). *Thèse de doctorat de l'Université de Lille 1*, 174p.
- BENNER, R. & BIDDANDA, B. (1998).** Photochemical transformations of surface and deep marine dissolved organic matter : Effects on bacterial growth. *Limnol. Oceanogr.*, 43, 1373-1378.

- BERGREEN, U., HANSEN, B. & KIORBOE, T. (1988).** Food size spectra, ingestion and growth of the copepod *Acartia tonsa* during development : implications for the determination of copepod production. *Mar. Biol.*, 99, 341-352.
- BERTONI, R. & CALLIERI, C. (1999).** The role of UV-B radiation on freshwater autotrophic and heterotrophic picoplankton in a subalpine lake. *J. Plankton Res.*, 21, 1373-1388.
- BODINEAU, L., THOUMELIN, G., BEGHIN, V. & WARTEL, M. (1998).** Particulate organic matter composition in the Estuarine Turbidity Maxima (ETM) of the Seine River estuary. *Hydrobiol.*, 373-374, 281-295.
- BOGDAN, K.G. & GILBERT, J.J. (1987).** Quantitative comparison of food niches in some freshwater zooplankton: a multi-tracer-cell approach. *Oecologia (Heidelb.)*, 72, 331-340.
- BONNET, D. & CARLOTTI, F. (2001).** Development and egg production in *Centropages typicus* (Copepoda: Calanoida) fed different food types: a laboratory study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 224, 133-148.
- BOURDIER, G. (1985).** Intérêts du dosage des acides gras particuliers pour l'étude d'un phytoplancton lacustre. *Thèse de doctorat de 3^e cycle de l'Université Blaise Pascal*, 112p.
- BOURDIER, G. & AMBLARD, C. (1987).** Evolution de la composition en acides gras d'un phytoplancton lacustre. *Int. Revue. Ges. Hydrobiol.*, 72, 81-95.
- BOURDIER, G.G. & AMBLARD, C.A. (1989).** Lipids in *Acanthodiaptomus denticornis* during starvation and fed on three different algae. *J. Plankton Res.*, 11(6), 1201-1212.
- BRAMLEY, P.M. & MACKENZIE, A. (1988).** Regulation of carotenoid biosynthesis. *Curr. Top. Cellul. Regul.*, 29, 291-343.
- BRATBAK, G. (1985).** Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1488-1493.

- BRATBAK, G. & THINGSTAD, T.F. (1985).** Phytoplankton-bacteria interactions : An apparent paradox? Analysis of a model system with both competition and commensalism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25, 23-30.
- BURNS, C.W. & SCHALLENBERG, M. (1998).** Impacts of nutrients and zooplankton on the microbial food web of an ultra-oligotrophic lake. *J. Plankton Res.*, 20(8), 1501-1525.
- BUSTILLOS-GUZMÁN, J., LOPEZ-CORTES, D., MATHUS, M.E. & HERNANDEZ, F. (2002).** Dynamics of pigment degradation by the copepodite stage of *Pseudodiaptomus euryhalinus* feeding on *Tetraselmis suecica*. *Mar. Biol.*, 140, 143-149.
- CALBET, A., LANDRY, M.R. & SCHEINBERG, R.D. (2000).** Copepod grazing in a subtropical bay : species-specific responses to a midsummer increase in nanoplankton standing stock. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193, 75-84.
- CALLIERI, C., PUGNETTI, A. & MANCA, M. (1999).** Carbon partitioning in the food web of a high mountain lake : from bacteria to zooplankton. *J. Limnol.*, 58(2), 144-151.
- CALLIERI, C., MORABITO, G., HUOT, Y., NEALE, P.J. & LITCHMAN, E. (2001).** Photosynthetic response of pico- and nanoplanktonic algae to UVB, UVA and PAR in a high mountain lake. *Aquat. Sci.*, 63, 286-293.
- CAMPBELL, R.W., HEAD, E.J.H. & GARDNER, W.S. (2000).** Organochlorine transfer in the trophic web of two oligotrophic lakes in Canadian northwest territories. *Can. J. Aquat. Sci.*, 56, 121-132.
- CAPBLANCQ, J. & LAVILLE, H. (1983).** Le lac de Port-Bielh (Pyrénées) : exemple de fonctionnement d'un écosystème lacustre de haute montagne. In : Lamotte, M. & Bourlière, F. (eds), *Structure et fonctionnement des écosystèmes limniques*. Paris, Masson, p.51-79.
- CARON, D.A. (1983).** Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton, using epifluorescence microscopy, and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46, 491-498.

- CARON, R.W., SANDERS, E.L., LIM, C., MARRASE, L.A., AMARAL, S., WHITNEY, R.B., AOKI, R.B. & PORTER, K.G. (1993).** Light-dependent phagotrophy in the freshwater mixotrophic chrysophyte *Dinobryon cylindricum*, *Microb. Ecol.*, 25, 93-111.
- CARRIAS, J.F., THOUVENOT, A., AMBLARD, C. & SIME-NGANDO, T. (2001).** Dynamics and growth estimates of planktonic protists during early spring in Lake Pavin, France. *Aquat. Microb. Ecol.*, 24, 163-174.
- CARRILLO, P., SANCHEZ-CASTILLO, P. & CRUZ-PIZARRO, L. (1991).** Coincident zooplankton and phytoplankton diel migration in a high mountain lake (La Caldera, Sierra Nevada, Spain). *Arch. Hydrobiol.*, 122, 57-67.
- CARRILLO, P., RECHE, I., SANCHEZ-CASTILLO, P. & CRUZ-PIZARRO, L. (1995).** Direct and indirect effects of grazing on the phytoplankton seasonal succession in an oligotrophic lake. *J. Plankton Res.*, 17(6), 1363-1379.
- CARRILLO, P., RECHE, I. & CRUZ-PIZARRO, L. (1996a).** Quantification of the phosphorus released by zooplankton in an oligotrophic lake (La Caldera, Spain) – Regulating factors and adjustment to theoretical-models. *J. Plankton Res.*, 18, 1567-1586.
- CARRILLO, P., RECHE, I. & CRUZ-PIZARRO, L. (1996b).** Intraspecific stoichiometric variability and the ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by zooplankton. *Freshwat. Biol.*, 36, 363-374.
- CARRILLO, P., VILLAR-ARGAIZ, M. & MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. (2001).** Relationship between N:P ratio and growth rate during the life cycle of calanoid copepods: An *in situ* measurement. *J. Plankton Res.*, 23(5), 537-547.
- CARRILLO, P., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. & VILLAR-ARGAIZ, M. (2002).** The interaction of phytoplankton and bacteria in a high mountain lake : Importance of the spectral composition of solar radiation. *Limnol. Oceanogr.*, 47, 1294-1306.

- CAVALETTO, J.F., VANDERPLOEG, H.A. & GARDNER, W.S. (1989).** Wax esters in two species of freshwater zooplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 34(4), 785-789.
- CHAMPEAU, A. (1970).** Recherches sur l'écologie et l'adaptation à la vie latente des Copépodes des eaux temporaires provençales et corses. *Thèse de doctorat de l'Université d'Aix-Marseille*.
- CHANGRUI, G. & HOLLANDER, D.J. (1997).** Differential contribution of bacteria to sedimentary organic matter in oxic and anoxic environments, Santa Monica Basin, California. *Org. Geochem.*, 26, 545-563.
- CHISHOLM, S.W. (1992).** Phytoplankton size. In : Falkowski, P.G. & Woodhead, A.D. (eds) *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*. New York, Plenum Press, p.213-237.
- CHRISTAKI, U., VAN WAMBEKE, F. & DOLAN, J.R. (1999).** Nanoflagellates (mixotrophs, heterotrophs and autotrophs) in the oligotrophic eastern Mediterranean : Standing stocks, bacterivory and relationships with bacterial production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 181, 297-307.
- CHRISTIE, W.W. (1989).** Gas chromatography and lipids. A practical guide. *The Oily Press, Dundee, Scotland*, 307p.
- CHUECAS, L. & RILEY, J. (1969).** Component fatty acids of the total lipids of some marine phytoplankton. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 49, 97-116.
- CLAUSTRE, H. (1987).** Variation de la composition biochimique du phytoplancton sous l'effet des changements du milieu. *Thèse de doctorat de l'Université de Paris VI*, 133p.
- CLAUSTRE, H., MARTY, J.C., CASSIANI, L. & DAGAUT, J. (1989).** Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian sea: ecological implications. *Mar. Microb. Food Webs*, 3, 51-66.

- CLAUSTRE, H., POULET, S.A., WILLIAMS, R., BEN-MLIH, F., JEZEQUEL, V. & MARTY, J.C. (1992).** Relationship between the qualitative nature of particles and copepod faeces in the Irish Sea. *Mar. Chem.*, 40, 231-248.
- COKER, R.E. (1933).** Influence of temperature on size in freshwater Copepods (*Cyclops*). *Int. Revue ges. Hydrobiol. Hydrogr.*, 29, 406-426.
- COMITA, G.W. (1956).** A study of a calanoid copepod population in an Arctic lake. *Ecology*, 37, 576-591.
- COMITA, G.W. & ANDERSON, G.C. (1959).** The seasonal development of a population of *Diaptomus ashlandi* Marsh and related phytoplankton cycles in Lake Washington. *Limnol. Oceanogr.*, 4, 37-52.
- CONOVER, R.J., DURVASULA, R., ROY, S. & WANG, R. (1986).** Probable loss of chlorophyll-derived pigments during passage through the gut of zooplankton, and some of the consequences. *Limnol. Oceanogr.*, 31, 878-887.
- CONTE, M.H., VOLKMAN, J.K. & EGLINTON, G. (1994).** Lipid biomarkers of the Haptophyt. In : Green, J.C. & Leadbeater, B.S.C. (eds) *The Haptophyte Algae. Systematics Association Special*, 51, p.351-377.
- CORKETT, C.J. & McLAREN, I.A. (1969).** Egg production and oil storage by the copepod *Pseudocalanus* in the laboratory. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 3, 90-105.
- CORKETT, C.J., McLAREN, I.A. & SEVIGNY, J.M. (1986).** The rearing of the marine calanoid copepods *Calanus finmarchicus* (Gunnerus), *C. glacialis* and *C. hyperboreus* Krøyer with comment on the equiproportional rule. *Syllogeus*, 58, 539-547.
- COTONNEC, G. (2001).** Les lipides, marqueurs des relations trophiques zooplanctoniques dans les écosystèmes pélagiques côtiers. *Thèse de doctorat de l'Université du Littoral Côte d'Opale*, 217p.

- COTONNEC, G., BRUNET, C., SAUTOUR, B. & THOUMELIN, G. (2001).** Nutritive value and selection of food particles by copepods during a spring bloom of *Phaeocystis* sp. in the English Channel, as determined by pigment and fatty acids analyses. *J. Plankton Res.*, 23(7), 693-703.
- COWLES, T.J., OLSON, R.J. & CHISHOLM, S.W. (1988).** Food selection by copepods : discrimination on the basis of food quality. *Mar. Biol.*, 100, 41-49.
- CRUZ-PIZARRO, L. (1983).** Reproductive activity of *Mixodiaptomus laciniatus* (Copepoda, Calanoida) in a high mountain lake (La Caldera, Granada, Spain). *Hydrobiol.*, 107, 97-105.
- CURRIE, D.J. (1990).** Large-scale variability and interactions among phytoplankton, bacterioplankton, and phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1437-1455.
- CURRIE, D.J. & KALLF, J. (1984).** A comparison of the abilities of freshwater algae and bacteria to acquire and retain phosphorus. *Limnol. Oceanogr.*, 29, 311-321.
- CYR, H. (1997).** Cladoceran- and copepod-dominated zooplankton communities graze at similar rates in low-productivity lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 55, 414-422.
- D'ABRAMO, L.R. (1989).** Lipid requirements of shrimp. In : *Advances in Tropical Aquaculture. AQUACOP-IFREMER, Tahiti*, p.271-285.
- DAGG, M. (1978).** Estimated, *in situ*, rates of egg production for the copepod *Centropages typicus* (Krøyer) in the New York Bight. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 34, 183-196.
- DAGG, M. & WALSER, W.E. (1987).** Ingestion, gut passage, and egestion by the copepod *Neocalanus plumchrus* in the laboratory and in the subarctic Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 32, 178-188.
- DAVIDOWICZ, P. & GLIWICZ, Z.M. (1987).** Biomanipulation. III. The role of direct and indirect relationship between phytoplankton and zooplankton. *Wiad. Eko.*, 33, 259-277.
- DELEBECQUE, A. (1898).** Les lacs français. *Cahmerot & Renouard (eds), Paris*, 436p.

DEMOTT, W.R. (1986). The role of taste in food selection by freshwater zooplankton.

Oecologia, 69, 334-340.

DEMOTT, W.R. (1988). Discrimination between algae and detritus by freshwater and

marine zooplankton. *Bull. Mar. Sci.*, 43, 486-499.

DEMOTT, W.R. (1995). Optimal foraging by a suspension-feeding copepod: Responses to

short-term and seasonal variation in food resources. *Oecologia*, 103, 230-240.

DEMOTT, W.R & MOXTER, F. (1991). Foraging on cyanobacteria by copepods:

responses to chemical defenses and resource abundance. *Ecology*, 72, 1820-1834.

DEMOTT, W.R & WHATSON, M.D. (1991). Remote detection of algae by copepods :

responses to algal size, odors and motility. *J. Plankton Res.*, 13(6), 1203-1222.

DEMOTT, W.R & MÜLLER-NAVARRA, D.C. (1997). The importance of highly

unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. *Freshwat. Biol.*, 38, 649-664.

DESCY, J.P., FROST, T.M. & HURLEY, J.P. (1999). Assessment of grazing by the

freshwater copepod *Diaptomus minutus* using carotenoid pigments : a caution. *J. Plankton Res.*, 21(1), 127-145.

DESVILETTES, C. (1994). Dynamique des acides gras dans la chaîne trophique

phytoplancton - zooplancton - larves de brochet et évolution des constituants lipidiques chez

le brochet (*Esox lucius* L.) aux premiers stades de vie. *Thèse de doctorat de l'Université*

Blaise Pascal, 222p.

DESVILETTES, C., BOURDIER, G., AMBLARD, C. & BARTH, B. (1997a). Use of

fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoan and microalgae.

Freshwater Biol., 38, 629-637.

- DESVILETTES, C., BOURDIER, G. & BRETON, J.C. (1997b).** On the occurrence of a possible bioconversion of linolenic acid into docosahexaenoic acid by the copepod *Eucyclops serrulatus* fed on microalgae. *J. Plankton Res.*, 19(2), 273-278.
- DEXTER, B.L. (1986).** Developmental grazing capabilities of *Pseudocalanus* sp. and *Acartia clausi* (CI to adult) : a comparative study of feeding. *Syllogeus*, 58, 547-551.
- DÖHLER, G. (1997).** Effect of UVB radiation on utilization of inorganic nitrogen by Antarctic microalgae. *Photochem. Photobiol.*, 66, 831-836.
- DOWNING, J.A. & RIGLER, F.H. (1984).** A manual on methods for the assessment of secondary productivity in fresh water. *IBP Handbook n° 17 Second Edition, London, Blackwell Scientific Publications, 501p.*
- DUNSTAN, G.A., VOLKMAN, J.K., JEFFREY, S.W. & BARRETT, S.M. (1992).** Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. II. Lipid classes and fatty acids. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 115-134.
- DUNSTAN, G.A., VOLKMAN, J.K., BARRETT, S.M., LEROI, J.M. & JEFFREY, S.W. (1994).** Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae), *Phytochem.*, 35(1), 155-161.
- EDERINGTON, M.C., McMANUS, G.B. & HARVEY, H.R. (1995).** Trophic transfer of fatty acids, sterols, and a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. *Limnol. Oceanogr.*, 40, 860-880.
- EICHHORN, R. (1957).** Zur populationsdynamik der Calanoiden Copepoden in Titisee und Feldsee. *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 24, 186-246.
- ELSER, J.J. & GOLDMAN, C.R. (1991).** Zooplankton effects on phytoplankton in lakes of contrasting trophic status. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 64-90.

- FALK-PETERSEN, S., HOPKINS, C.C.E. & SARGENT, J.R. (1990).** Trophic relationships in the pelagic arctic food web. In : Barnes, M. & Gibson, R.N. (eds.) *Trophic relationships in the environment*. Aberdeen, Aberdeen University Press, p.315-333.
- FALK-PETERSEN, S., SARGENT, J.R., LØNNE, O.J. & TIMOFEEV, S. (1999).** Functional biodiversity of lipids in Antarctic zooplankton : *Calanoides acutus*, *Calanus propinquus*, *Thysanoessa macrura* and *Euphausia crystallorophias*. *Polar Biol.*, 21, 37-47.
- FALK-PETERSEN, S., HAGEN, W., KATTNER, G., CLARKE, A. & SARGENT, J.R. (2000).** Lipids, trophic relationships, and biodiversity in Arctic and Antarctic krill. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57(3), 178-191.
- FERNANDEZ, F. (1979).** Nutrition studies in the nauplius larva of *Calanus pacificus* (Copepoda: Calanoida). *Mar. Biol.*, 53, 131-147.
- FERRARI, I. (1971).** Notes on the dynamics of the reproductive activity of *Arctodiaptomus bacillifer* in high alpine lakes. *Bool. Zool.*, 38, 221-235.
- FINDLAY, R.H. & DOBBS, F.C. (1993).** Quantitative description of microbial communities using lipid analysis. In : Kemp, P.F., Sherr, B., Sherr, E.B. & Cole, J.J. (eds) *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis, Boca Raton, FL, p.271-284.
- FOLCH, J.M., LESS, M. & STANLEY, G.H. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- FREDERICKSON, H.L., CAPENBERG, T.E. & LEEUW, J.W. (1986).** Polar lipid ester linked fatty acids composition of Lake Vechten: an ecological application of lipid analysis. *FEMS Microbial. Ecol.*, 38, 381-396.
- FULLER, J.L. (1937).** Feeding rate of *Calanus finmarchicus* in relation to environmental conditions. *Biol. Bull.*, 71, 233-246.
- FUNDEL, B., STICH, H.-B., SCHMID, H. & MAIER, G. (1998).** Can phaeopigments be used as markers for *Daphnia* grazing in Lake Constance? *J. Plankton Res.*, 20, 1449-1462.

- GASPARINI, S., CASTEL, J. & IRIGOIEN, X. (1999).** Impact of suspended particulate matter on egg production of the estuarine copepod, *Eurytemora affinis*. *J. Mar. Syst.*, 22, 195-205.
- GASPARINI, S., DARO, M.H., ANTAJAN, E., TACKX, M., ROUSSEAU, V., PARENT, J.Y. & LANCELOT, C. (2000).** Mesozooplankton grazing during the *Phaeocystis globosa* bloom in the southern Bight of the North Sea. *J. Sea. Res.*, 43(3-4), 345-356.
- GATTEN, R.R., SARGENT, J.R., FORSBERG, T.E.V., O'HARA, S.C.M. & CORNER, E.D.S. (1980).** On the nutrition and metabolism of zooplankton. XIV. Utilization of lipid by *Calanus helgolandicus* during maturation and reproduction. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 60, 391-399.
- GEISE, A.C. (1966).** Lipids in the economy of marine invertebrates. *Physiol. Rev.*, 46, 244-298.
- GIESKES, W.W. & KRAAY, G.W. (1986).** Analysis of phytoplankton pigments by HPLC before, during and after mass occurrence microflagellate *Corymbellus aureus* during the spring bloom in the open North Sea in 1983. *Mar. Biol.*, 92, 45-52.
- GLIWICZ, Z.M. (1969).** Studies on the feeding of pelagic zooplankton in lakes with varying trophic. *Ekol. Pol. A*, 17, 663-708.
- GLIWICZ, Z.M. (1985).** Predation of food limitation : an ultimate reason for extinction of planktonic cladoceran species. *Arch. Hydrobiol.*, 21, 419-430.
- GOAD, L.J. (1981).** Sterol biosynthesis and metabolism in marine invertebrates. *Pure and Appl. Chem.*, 51, 837-852.
- GORDILLO, F.L.J., GOUTX, M., FIGUEROA, F.L. & NIELL, F.X. (1998).** Effects of the light intensity, CO₂ and nitrogen supply on lipid class composition of *Dunaliella viridis*. *J. Applied Phycol.*, 10, 135-144.

- GOULDEN, C.E. & PLACE, A.R. (1990).** Fatty acid synthesis and accumulation rates in Daphnids. *Exp. Zool.*, 266, 168–178.
- GOULDEN, C.E., MOELLER, R.E., Mc NAIR, J. & PLACE, A.R. (1998).** Lipid dietary dependencies in zooplankton. In : Arts, M.T. & Wainman, B.C. (eds) *Lipids in Freshwater Ecosystems*, New York, Springer-Verlag, p.91-108.
- GOUTX, M. (1988).** Particulate lipid survey in the Bedford basin (Nova Scotia) using thin layer chromatography with flame ionization detection. Comparison of hydrocarbons data with gas chromatography analysis. *Mar. Env. Res.*, 26, 83-95.
- GRAY, J.C. (1987).** Control of isoprenoid synthesis in higher plants. *Adv. Bot. Res.*, 14, 25-91.
- GREEN, E.P., HARRIS, R.P. & DUNCAN, A. (1992).** The production and ingestion of faecal pellets by nauplii of marine calanoid copepods. *J. Plankton Res.*, 14, 1631-1643.
- GRICE, K., KLEIN BRETELER, W.C.M., SCHOUTEN, S., GROSSI, V., DE LEEUW, J.W. & SINNINGHE DAMSTÉ, J.S. (1998).** Effects of zooplankton herbivory on biomarker proxy records. *Paleoceanography*, 13(6), 686-693.
- GUISANDE, C., MANEIRO, I., RIVEIRO, I., BARREIRO, A. & PAZOS, Y. (2002).** Estimation of copepod trophic niche in the field using amino acids and marker pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 239, 147-156.
- GULATI, R.D. & DEMOTT, W.R. (1997).** The role of food quality for zooplankton : remarks of the state of the arts, perspectives and priorities. *Freshwater Biol.*, 38, 753-768.
- GURNEY, R. (1929).** Dimorphism and rate of growth in Copepoda. *Int. Revue Hydrobiol.*, 21, 189-207.
- HAGEN, W. & KATTNER, G. (1998).** Lipid metabolism of the Antarctic euphausiid *Thysanoessa macrura* and its ecological implications. *Limnol. Oceanogr.*, 43(8), 1894-1901.

- HAKANSON, J.L. (1984).** The long and short term feeding condition in field – caught *Calanus pacificus*, as determined from the lipid content. *Limnol. Oceanogr.*, 29, 794-804.
- HALLEGRAEFF, G.M. (1981).** Seasonal study of phytoplankton pigments and species at a coastal station off Sydney : importance of diatoms and nanoplankton. *Mar. Biol.*, 61, 107-118.
- HALSBAND-LENK, C., NIVAL, S., CARLOTTI, F. & HIRCHE, H.-J. (2001).** Seasonal cycles of egg production of two planktonic copepods, *Centropages typicus* and *Temora stylifera*, in the north-western Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, 23(6), 597-609.
- HANSEN, F.C. & VAN BÖECKEL, W.H.M. (1991).** Grazing pressure of the calanoid copepod *Temora longicornis* on a *Phaeocystis* dominated spring bloom in a Dutch tidal inlet. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 78, 123-129.
- HANSEN, B.W., HYGUM, B.H., BROZEK, M., JENSEN, F. & REY, C. (2000).** Food web interactions in a *Calanus finmarchicus* dominated pelagic ecosystem – a mesocosm study. *J. Plankton Res.*, 22(3), 569-588.
- HARRIS, R.P. & MALEJ, A. (1986).** Diel patterns of ammonium excretion and grazing rhythms in *Calanus helgolandicus* in surface stratified waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 31, 75-85.
- HART, R.C. & SANTER, B. (1994).** Nutritional suitability of some uni-algal diets for freshwater calanoids: unexpected inadequacies of commonly used edible greens and others. *Freshwater Biol.*, 31, 109-116.
- HARVEY, H.R., EGLINTON, G., O'HARA, S.C.M. & CORNER, E.D.S. (1987).** Biotransformation and assimilation of dietary lipids by *Calanus* feeding on a dinoflagellate. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51, 3031-3040.
- HARVEY, H.R., EDERINGTON, M.C. & McMANUS, G.B. (1997).** Lipid composition of the marine ciliates *Pleuronema* sp. and *Fabrea salina* : shifts in response to changes in diet. *J. Eukaryotic Microbiol.*, 44, 189-193.

- HAZZARD, S.E. & KLEPPEL, G.S. (2003).** Egg production of the copepod *Acartia tonsa* in Florida Bay: role of fatty acids in the nutritional composition of the food environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 252, 199-206.
- HEAD, E.J.H. (1988).** Copepod feeding behaviour and the measurement of grazing rates *in vivo* and *in vitro*. *Hydrobiol.*, 167/168, 31-41.
- HEAD, E.J.H. (1992).** Gut pigment accumulation and destruction by arctic copepods *in vitro* and *in situ*. *Mar. Biol.*, 112, 583-592.
- HEAD, E.J.H. & HARRIS, L.R. (1992).** Chlorophyll and carotenoid transformation and destruction by *Calanus* spp. grazing on diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 86, 229-238.
- HEAD, E.J.H. & HARRIS, L.R. (1994).** Feeding selectivity by copepods grazing on natural mixtures of phytoplankton determined by HPLC analysis of pigments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 110, 75-83.
- HEAD, E.J.H. & HARRIS, L.R. (1996).** Chlorophyll destruction by *Calanus* spp. grazing on phytoplankton: Kinetics, effects of ingestion rate and feeding history, and a mechanistic interpretation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 135, 223-235.
- HENDERSON, R.J., MILLAR, R.M. & SARGENT, J.R. (1995).** Effect of growth temperature on the positional distribution of eicosapentaenoic acid and trans hexadecenoic acid in the phospholipids of a vibrio species of bacterium. *Lipids*, 30(2), 181-185.
- HESSEN, D.O., VAN DONK, E. & ANDERSEN, T. (1995).** Growth responses, P-uptake and loss of flagella in *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to UV-B. *J. Plankton Res.*, 17, 17-27.
- HINDER, B., BAUR, I., HANSELMANN, K. & SCHANZ, F. (1999).** Microbial food web in an oligotrophic high mountain lake (Jöri Lake III, Switzerland). *J. Limnol.*, 58(2), 162-168.
- HIRCHE, H.J. (1990).** Egg production of *Calanus finmarchicus* at low temperature. *Mar. Biol.*, 106, 53-58.

- HIRCHE, H.J. (1992).** Egg production of *Eurytemora affinis*. Effect of k-strategy. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 35, 395-407.
- HIRCHE, H.J., MEYER, U. & NIEHOFF, B. (1997).** Egg production of *Calanus finmarchicus* – effect of food, temperature and season. *Mar. Biol.*, 127, 609-620.
- HOBBIE, J.E., BAHR, M., BETTEZ, N. & RUBLEE, P.A. (2000).** Microbial food webs in oligotrophic arctic lakes. In : Bell, C.R., Brylinsky, M. & Johnson-Green, P. (eds) *Microbial Biosystems : New Frontiers, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, p. 293-298.
- HOLZ, G.C. & CONNER R.L. (1987).** The composition, metabolism and roles of lipids in *Tetrahymena*. In : Elliot, A.M. (eds) *The Biology of Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson and Ross Inc, Stoudburg, p.99-122.
- HOOKS, C.E., BIDIGARE, R.R., KELLER, M.D. & GUILLARD, R.R.L. (1988).** Coccoid eukaryotic marine ultraplankters with four HPLC pigment signatures. *J. Phycol.*, 24, 571-580.
- HOPKINS, C.C.E., TANDE, K.S., GRONVIK, S. & SARGENT, J.R. (1984).** Ecological investigations of the zooplankton community of Balsfjorden, northern Norway : an analysis of growth and overwintering tactics in relation to niche and environment in *Metridia longa* (Lubbock), *Calanus finmarchicus* (Gunnerus), *Thysanoessa inermis* (Kroyer) and *T. rashi* (M. Sars). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 82, 77-99.
- HUNTLEY, M. (1988).** Feeding biology of *Calanus* : a new perspective. *Hydrobiol.*, 167/168, 83-99.
- HUNTLEY, M., SYKES, S., ROHAN, S. & MARIN, V. (1986).** Chemically-mediated rejection of dinoflagellate prey by the copepods *Calanus pacificus* and *Paracalanus parvus* : Mechanism, occurrence and significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28, 1-2.

- HUNTLEY, M., TANDE, K. & EILERTSEN, H.C. (1987).** On the trophic fate of *Phaeocystis pouchetii* (Hariot). 2. grazing rates of *Calanus hyperboreus* (Krøyer) on diatoms and different size categories of *Phaeocystis pouchetii*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 110, 197-212.
- HUNTLEY, M.E. & LOPEZ, M.D.G. (1992).** Temperature-dependent production of marine copepods : a global synthesis. *Am. Nat.*, 140, 201-242.
- HUTCHINSON, G.E. (1967).** A treatise on limnology, v. 2. Wiley.
- HYGUM, B.H., REY, C., HANSEN, B.W. & TANDE, K.S. (2000).** Importance of food quantity to structural growth rate and neutral lipid reserves accumulated in *Calanus finmarchicus*. *Mar. Biol.*, 136, 1057-1073.
- IATRIDES, M.C., ARTAUD, J. & VICENTE, N. (1983).** Composition en stérols des végétaux marins méditerranéens. *Oceanol. Acta*, 6, 73-77.
- INFANTE, A.G. (1981).** Natural food of copepod larvae from Lake Valencia, Venezuela. *Verh. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.*, 21, 709-714.
- IRIGOIEN, X. (2004).** Some ideas about the role of lipids in the life cycle of *Calanus finmarchicus*. *J. Plankton Res.*, 26(3), 259-263.
- IRIGOIEN, X., HEAD, R.N., HARRIS, R.P., CUMMINGS, D., HARBOUR, D. & MEYER-HARMS, B. (2000).** Feeding selectivity and egg production of *Calanus helgolandicus* in the English Channel. *Limnol. Oceanogr.*, 45(1), 44-54.
- IVLEV, V.S. (1961).** Experimental ecology of the feeding of fishes. *New Haven : Yale Univ. Press*.
- JEFFREY, S.W. & VESK, M. (1997).** Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures. In : *Phytoplankton pigments in oceanography*. Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W. (eds), Paris, UNESCO, p.37-84.

- JERSABEK, C.D., BRANCELJ, A., STOCH, F. & SCHABETSBERGER, R. (2001).** Distribution and ecology of copepods in mountainous regions of the Eastern Alps. *Hydrobiol.*, 453/454, 309-324.
- JOHNS, R.B., NICHOLS, P.D. & PERY, G.J. (1979).** Fatty acid composition of ten marine algae from Australian waters. *Phytochem.*, 18, 799-802.
- JOHNSON, P.W., HUAI-SHU, X. & SIEBURTH, J.M. (1982).** The utilization of chroococcoid cyanobacteria by marine protozooplankters but not by calanoid copepods. *Ann. Inst. Oceanogr. Paris Nouv. Ser.*, 58, 297-308.
- JÓNASDÓTTIR, S. (1994).** Effects of food quality on the reproduction success of *Acartia tonsa* and *Acartia hudsonica*: laboratory observations. *Mar. Biol.*, 121, 67-81.
- JÓNASDÓTTIR, S. (1999).** Lipid content of *Calanus finmarchicus* during overwintering in the Faroe-Shetland Channel. *Fish. Oceanogr.*, 8(1), 61-72.
- JU, S.J. & HARVEY, H.R. (2004).** Lipids as markers of nutritional condition and diet in the Antarctic krill *Euphausia superba* and *Euphausia crystallorophias* during austral winter. *Deep-Sea Res. II*, 51, 2199-2214.
- JUHL, A.R., OHMAN, M.D. & GOERICKE, R. (1996).** Astaxanthin in *Calanus pacificus* : Assessment of pigment-based measures of omnivory. *Limnol. Oceanogr.*, 41(6), 1198-1207.
- KANAZAWA, A. (1984).** Nutrition requirements and artificial diets of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. In : Sindermann, C.T. (eds). *Proceedings of 9th and 10th U.S.-Japan meetings on aquaculture*, NOAA Tech. Rep. NMFS 16. Natl. Mar. Fish. Serv., Kyoto, p.3-7.
- KANAZAWA, A. (2000).** Nutrition and food. In : Phillips, S.E. & Kittaka, J. (eds) *Spiny Lobsters: Fisheries and Culture*. Fishing News Books, London, p. 611-624.
- KANAZAWA, A. (2001).** Sterols in marine invertebrates. *Fisheries Sci.*, 67, 997-1007.

- KANAZAWA, A., TESHIMA, S.-I. & ONO, K. (1979).** Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity of bioconversion of linolenic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 63B, 295-298.
- KANAZAWA, A., CHIM, L. & LAUBIER, L. (1988).** Tissue uptake of radioactive cholesterol in the prawn *Penaeus japonicus* Bate during ovarian maturation. *Aquat. Living Resour.*, 1, 85-91.
- KATTNER, G. & KRAUSE, M. (1987).** Changes in lipids during the development of *Calanus finmarchicus* from copepodit I to adult. *Mar. Biol.*, 96, 511-518.
- KATTNER, G., HIRCHE, H.J. & KRAUSE, M. (1989).** Spatial variability in lipid composition of calanoid copepods from Fram Strait the Artic. *Mar. Biol.*, 102, 473-480.
- KATTNER, G., GRAEVE, M. & HAGEN, W. (1994).** Ontogenetic and seasonal changes in lipid and fatty acid/alcohol compositions of the dominant Antarctic copepods *Calanus propinquus*, *Calanoides acutus* and *Rhincalanus gigas*. *Mar. Biol.*, 118, 637-644.
- KATTNER, G. & HAGEN, W. (1995).** Polar herbivorous copepods – different pathways in lipid biosynthesis. *ICES J. mar. Sci.*, 52, 329-335.
- KERFOOT, W.C. & KIRK, K.L. (1991).** Degree of taste discrimination among suspension-feeding cladocerans and copepods – implications for detritivory and herbivory. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 1107-1123.
- KLEPPEL, G.S. (1998).** The fate of the carotenoid pigment fucoxanthin during the passage through the gut: pigment recovery as a function of copepod species, season and food concentration. *J. Plankton Res.*, 20(10), 2017-2028.
- KLEPPEL, G.S. & PIEPER, R.E. (1984).** Phytoplankton pigments in the gut contents of planktonic copepods from coastal waters off southern California. *Mar. Biol.*, 78, 193-198.
- KLEPPEL, G.S., FRAZEL, D., PIEPER, R.E. & HOLLIDAY, D.V. (1988).** Natural diets of zooplankton off southern California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 49, 231-241.

- KLEPPEL, G.S., HOLLIDAY, D.V. & PIEPER, R.E. (1991).** Trophic interactions between copepods and microplankton: a question about the role of diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 172-178.
- KLEPPEL, G.S., BURKART, C.A. & HOUCHIN, L. (1998a).** Nutrition and the regulation of egg production in the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Limnol. Oceanogr.*, 43(5), 1000-1007.
- KLEPPEL, G.S., BURKART, C.A., HOUCHIN, L. & TOMAS, C. (1998b).** Egg production of the copepod *Acartia tonsa* in Florida Bay during summer. 1. the roles of food environment and diet. *Estuaries*, 21, 328-339.
- KOLATTUKUDY, P.E. (1976).** Chemistry and biochemistry of natural waxes. *Amsterdam, Elsevier*. 460p.
- KOSKI, M., KLEIN BRETELER, W.C.M. & SCHOGT, N. (1998).** Effect on food quality on rate and growth and development of the pelagic copepod *Pseudocalanus elongatus* (Copepoda, Calanoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170, 169-187.
- LAIR, N. & HILAL, M. (1992).** *Acanthodaptomus denticornis*, another omnivorous calanoid copepod : description of its mouth appendages and feeding experiments on animal prey. *Hydrobiol.*, 248, 137-142.
- LANDRY, M.R. (1978).** Population dynamics and production of a planktonic marine copepod, *Acartia clausii*, in a small temperate lagoon on San Juan Island, Washington. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 63, 77-119.
- LANDRY, M.R. (1983).** The development of the marine calanoid copepods with comment of the isochronal rule. *Limnol. Oceanogr.*, 28, 614-624.
- LANDRY, M.R., PETERSON, W.K. & FAGERNESS, V.L. (1994).** Mesozooplankton grazing in the Southern California Bight. I. Population abundances and gut pigment contents. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 115, 55-71.

- LANGWORTHY, D.E., STAPLETON, R.D., SAYLER, G.S. & FINDLAY, R.H. (1998).** Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 3422-3428.
- McLAREN, I.A. (1969).** Population and production ecology of zooplankton in Ogac Lake, a landlocked fjord on Baffin Island. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26, 1485-1559.
- McLAREN, I.A. & CORKETT, C.J. (1978).** Unusual genetic variation in body size, development times, oil storage and survivorship in the marine copepod *Pseudocalanus*. *Biol. Bull.*, 155, 347-359.
- LAUFER, H., AHL, J.S.B. & SAGI, A. (1993).** The role of juvenile hormones in crustacean reproduction. *Ann. Zool.*, 33, 365-374.
- LAURION, I., VENTURA, M., CATALAN, J., PSENNER, R. & SOMMARUGA, R. (2000).** Attenuation of ultraviolet radiation in mountain lakes : Factors controlling the among- and within-lake variability. *Limnol. Oceanogr.*, 45, 1274-1288.
- LAWRENCE, S.G., AHMAD, A. & AZAM, F. (1993).** Fate of particle-bound bacteria ingested by *Calanus pacificus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 97, 299-307.
- LAYBOURN-PARRY, J. & WALTON, M. (1998).** Seasonal heterotrophic flagellate and bacterial plankton dynamics in a large oligotrophic lake : Loch Ness, Scotland. *Freshwat. Biol.*, 39(1), 1-8.
- LEE, R.F., HIROTA, J. & BARNETT, A.M. (1971a).** Distribution and importance of wax esters in marine copepods and other zooplankton. *Deep-Sea Res.*, 18, 1147-1165.
- LEE, R.F., NEVENZEL, J.C. & PAFFENHÖFER, G.-A. (1971b).** Importance of wax esters and other lipids in the marine food chain : phytoplankton and copepods. *Mar. Biol.*, 9, 99-108.

- LEE, R.F., NEVENZEL, J.C. & PAFFENHÖFER, G.-A. (1972).** The presence of wax esters in marine planktonic copepods. *Naturwissenschaften*, 59, 406-411.
- LEE, R.F., NEVENZEL, J.C. & LEWIS, A.G. (1974).** Lipid changes during life cycle of marine copepod, *Euchaeta japonica* Marukawa. *Lipids*, 9(11), 891-898.
- LEE, R.F. & BARNES, A.T. (1975).** Lipids in the mesopelagic copepod *Gaussia pinceps*. Wax ester utilization during starvation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 50B, 1-4.
- LEHMAN, J.T. & SANDGREN, C.D. (1982).** Phosphorus dynamics of the prokaryotic nanoplankton in a Michigan lake. *Limnol. Oceanogr.*, 27, 828-883.
- LEVEILLE, J.C. (1997).** Flux de matière en milieu pélagique lacustre : utilisation des acides gras comme marqueurs organiques naturels du transfert dans la chaîne trophique phytoplancton- zooplancton-alevins d'omble chevalier (*Salvelinus alpinus*). *Thèse de doctorat de l'Université Blaise Pascal*, 227p.
- LEVEILLE, J.C., AMBLARD, C. & BOURDIER, G. (1997).** Fatty acids as specific algal markers in a natural phytoplankton. *J. Plankton Res.*, 19, 469-490.
- LOPEZ, M.D.G., HUNTLEY, M.E. & LOVETTE, J.T. (1988a).** *Calanoides acutus* in Gerlache Strait, Antarctica. I. Distribution of the late copepodite stages and reproduction during spring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 100, 153-165.
- LOPEZ, M.D.G., HUNTLEY, M.E. & SYKES, P.F. (1988b).** Pigment destruction by *Calanus pacificus* : impact on the estimation of water column fluxes. *J. Plankton Res.*, 10, 715-734.
- LYTLE, J.S., LYTL, T.F. & OGLE, J. (1990).** Polyunsaturated fatty acid profiles as a comparative tool in assessing maturation diets of *Penaeus vannamei*. *Aquacult.*, 89, 287-299.
- MACKAS, D. & BOHRER, R. (1976).** Fluorescence analysis of zooplankton gut content and an investigation of diel feeding patterns. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 25, 77-85.

- MALEJ, A. & HARRIS, R.P. (1993).** Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 96, 33–42.
- MANTOURA, R.F.C. & LLEWELLYN, C.A. (1983).** The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 151, 297-314.
- MARGALEF, R. (1955).** Temperature, dimensiones y evolución. *P. Inst. Biol. apl.*, 19, 13-94.
- MARSHALL, S.M. (1924).** The food of *Calanus finmarchicus* during 1923. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 13, 473-479.
- MAYZAUD, P., EATON, C.A. & ACKMAN, R.G. (1976).** The occurrence and distribution of octadecapentaenoic acid in a natural plankton population. A possible food chain index. *Lipids*, 11, 858-862.
- MAYZAUD, P., CHANUT, J.P. & ACKMAN, R.G. (1989).** Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate matter with special reference to fatty acids and sterols. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 56, 189-204.
- MAYZAUD, P. & RAZOULS, S. (1992).** Degradation of gut pigment during feeding by a subantarctic copepod : importance of feeding history and digestive acclimatation. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 393-404.
- MEDD & AGENCES DE L'EAU (2003).** Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau (SEQ-eau). Grilles d'évaluation version 2. 40p.
- MEDINA-SÁNCHEZ, J., VILLAR-ARGAIZ, M., SÁNCHEZ-CASTILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L. & CARRILLO, P. (1999).** Structure changes in a planktonic food web : biotic and abiotic controls. *J. Limnol.*, 58(2), 213-222.

- MEDINA-SÁNCHEZ, J., VILLAR-ARGAIZ, M. & CARRILLO, P. (2004).** Neither with nor without you : A complex algal control on bacterioplankton in a high mountain lake. *Limnol. Oceanogr.*, 49(5), 1722-1733.
- MENDEN-DEUER, S. & LESSARD, E.J. (2000).** Carbon to volume relationship for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.*, 45(3), 569-579.
- METCALFE, L.D. & SCHMITZ (1961).** The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analyt. Chem.*, 33, 363-364.
- MEYBECK, M., MARTIN, J.M. & OLIVE, P. (1975).** Géochimie des eaux et des sédiments de quelques lacs volcaniques du Massif Central français. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19, 1150-1164.
- MEYER-HARMS, B., IRIGOIEN, X., HEAD, R.N. & HARRIS, R.P. (1999).** Selective feeding on natural phytoplankton by *Calanus finmarchicus* before, during and after the 1997 spring bloom in the Norwegian Sea. *Limnol. Oceanogr.*, 44, 265-283.
- MEZ, K., HANSELMANN, K. & PREISIG, H.R. (1998).** Environmental conditions in high mountain lakes containing toxic benthic cyanobacteria. *Hydrobiol.*, 368, 1-15.
- MIDDLEDITCH, B.S., MISSLER, S.R., HINES, H.B., McVEY, J.B., BROWN, A., WARD, D.G. & LAWRENCE, A.L. (1980).** Metabolic profiles of penaeid shrimp : dietary lipids and ovarian maturation. *J. Chromatogr.*, 195, 359-368.
- MILLIE, A., PEARL, H.W. & HURLEY, J.P. (1993).** Microalgal pigment assessment using HPLC : a synopsis of organismal and ecological applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50, 2513-2527.
- MIRACLE, R. (1976).** Distribución en el espacio y en el tiempo de las especies de zooplankton del lago Bañolas. *ICONA Monografías* 5, 270p.

- MORALES, C.E., BEDO, A., HARRIS, R.P. & TRANTER, P.R.G. (1991).** Grazing of copepod assemblages in the north – east Atlantic : the importance of the small size fraction. *J. Plankton Res.*, 13(2), 455-472.
- MØLLER, E.F., THOR, P. & NIELSEN, T.G. (2003).** Production of DOC by *Calanus finmarchicus*, *C. glacialis* and *C. hyperboreus* through sloppy feeding and leakage from fecal pellets. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 262, 185-191.
- MORALES, C.E., HARRIS, R.P., HEAD, R.N. & TRANTER, P.R.G. (1993).** Copepod grazing in the oceanic northeast Atlantic during a 6 week drifting station : the contribution of sizes classes and vertical migrants. *J. Plankton Res.*, 15, 185-211.
- MORENTE, G. & RODRIGUEZ, A. (1991).** Variation in lipid content of wild-caught females of the marine shrimp *Penaeus kerathurus* during sexual maturation. *Mar. Biol.*, 110, 21-28.
- MORRISON W.R. & SMITH, L.M. (1964).** Preparation of fatty acid methyl-esters and dimethyl acetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lip. Res.*, 5, 600-608.
- MOTODA, S. (1959).** Devices of simple plankton apparatus. *Mem. of the Faculty of Fisheries Hokkaido University*. 7, 73–94.
- MUDGE, S.M. & NORRIS, C.E. (1997).** Lipid biomarkers in the Conwy Estuary (North Wales, UK) : a comparison between fatty alcohols and sterols. *Mar. Chem.*, 57(1), 61-84.
- MULLIN, M.M. & BROOKS, E.R. (1970).** The effect of concentration of food on body weight, cumulative ingestion, and rate of growth of marine copepod *Calanus helgolandicus*. *Limnol. Oceanogr.*, 15, 748-755.
- NANTON, D.A. & CASTELL, J.D. (1998).** The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe sp.*, for use as a live food for marine fish larvae. *Aquacult.*, 163, 251-261.

- NAPOLITANO, G.E. (1998).** Fatty acids as trophic and chemical markers. *In : Arts M.T., Wainman, B.C. (eds) Lipids in freshwater ecosystems. New York, Springer-Verlag, p.21-44.*
- NEAL, A.C., PRAHL, F.G., EGLINTON, G., O'HARA, S.C.M. & CORNER, E.D.S. (1986).** Lipid changes during a planktonic feeding sequence involving unicellular algae, *Elminius nauplii* and adult *Calanus*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 66, 1-13.
- NELSON, J.R. (1989).** Phytoplankton pigments in macrozooplankton faeces : variability in carotenoid alterations. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 52, 129-144.
- NELSON, M.M., MOONEY, B.D., NICHOLS, P.D. & PHLEGER, C.F. (2001).** Lipids of Antarctic Ocean amphipods : food chain interactions and the occurrence of novel biomarkers. *Mar. Chem.*, 73, 53-64.
- NICHOLLS, A.G. (1933).** On the biology of *Calanus finmarchicus*. III. Vertical distribution and diurnal migration in the Clyde Sea area. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 19, 139-164.
- NICHOLS, B.W. (1973).** Lipid composition and metabolism. *In : Car., N.G. & Whitton, B.A. (eds) The biology of blue-green algae. Blackwells, Oxford, p.144-161.*
- NICHOLS, P.D., VOLKMAN, J.K. & JOHNS, R.B. (1983).** Sterols and fatty acids of the marine unicellular algae, FCRG 51. *Phytochem.*, 22(6), 1447-1452.
- NICHOLS, P.D., JONES, G.L., DE LEEUW, J.W. & JOHNS, R.B. (1984).** The fatty acid and sterols composition of two marine dinoflagellates. *Phytochem.*, 23, 1043-1047.
- NIEDERHAUSER, P. (1993).** Diatomeen als Bioindikatoren zur Beurteilung des Belastung elektrolytarmer Hochgebirgsseen durch Säuren und Nährstoffe. *PhD. Thesis, Université de Zürich, 110p.*
- NIEHOFF, B., KLENKE, U., HIRCHE, H.J., IRIGOIEN, X., HEAD, R.N. & HARRIS, R.P. (1999).** A high frequency time series at Weathership M, Norwegian Sea, during the 1997 spring bloom : the reproductive biology of *Calanus finmarchicus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 176, 81-92.

- NORSKER, N.H. & STØTTRUP, J.G. (1994).** The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Tisbe holothuriae* Humes. *Aquacult.*, 125, 155-166.
- NYGAARD, K. & TOBIESEN, A. (1993).** Bacterivory in algae – A survival strategy during nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 273-279.
- OCDE (1982).** Eutrophication of waters. Monitoring, Assessment and Control. Final Report. *OECD Cooperative Program on Monitoring of Inland Waters (Eutrophication Control)*, Environment Directorate, OECD, Paris, 154p.
- ORCUTT, D.M. & PATTERSON, G.W. (1975).** Sterol, fatty acid and elemental composition of diatoms grown in chemically defined media, *Comp. Biochem. Physiol.*, 50B, 579-583.
- OWEN, T.G. & FALKOWSKY, P.G. (1982).** Enzymatic degradation of chlorophyll a by marine phytoplankton *in vitro*. *Phytochem.*, 21, 979-984.
- PAFFENHÖFER, G.A. (1988).** Feeding rates and behavior of zooplankton. *Bull. Mar. Sci.*, 43, 430-445.
- PAFFENHÖFER, G.A. (1998).** Heterotrophic protozoa and small metazoan: feeding rates and prey-consumer interactions. *J. Plankton Res.*, 20, 121-133.
- PANDOLFINI, E., THYS, I., LEPORCQ, B. & DESCY, J.P. (2000).** Grazing experiments with two freshwater zooplankters: fate of chlorophyll and carotenoid pigments. *J. Plankton Res.*, 22(2), 305-319.
- PAPST, M.H. & HOPKI, G.E. (1984).** Development of an Arctic charr *Salvelinus alpinus* L. brood stock. *Aquacult.*, 43, 323-331.
- PARKES, R.J. & TAYLOR, J. (1983).** The relationship between fatty acid distributions and bacterial respiratory types in contemporary marine sediments. *Estuar. Coast. And Shelf Sc.*, 16, 173-189.

- PARRISH, C.C. (1987).** Time series of particulate and dissolved lipid classes during spring phytoplankton blooms in Bedford bassin, a marine inlet. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 35, 129-139.
- PARRISH, C.C. & WANGERSKY, P.J. (1987).** Particulate and dissolved lipid classes in cultures of *Phaeodactylum tricornutum* grown in cage culture turbidostats with a range of nitrogen supply rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 35, 119-128.
- PARRISH, C.C., ABRAJANO, T.A., BUDGE, S.M., HELLEUR, R.J., HUDSON, E.D., PULCHAN, K. & RAMOS, C. (2000).** Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems : analysis and applications. In : Wangersky, P. (eds) *The Handbook of Environmental Chemistry*, 5(D), Berlin, p.193-223.
- PASTERNAK, S. (1994).** Gut fluorescence in herbivorous copepods: an attempt to justify the method. *Hydrobiol.*, 292/293, 241-248.
- PECHLANER, R. (1971).** Factors that control the production rate and biomass of phytoplankton in high mountain lakes. *Mitt. Int. Ver. Limnol.*, 19, 125-145.
- PEDRÓS-ALIÓ, C., CALDERÓN-PAZ, J.I. & GASOL, J.M. (2000).** Comparative analysis shows that bacterivory, no viral lysis, controls the abundance of heterotrophic prokaryotic plankton. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 32, 157-165.
- PEDUZZI, P. & HERNDL, G.J. (1992).** Zooplankton activity fueling the microbial loop – differential growth-response of bacteria from oligotrophic and eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 1087-1092.
- PELMONT, J. (1993).** Bactéries et environnement – Adaptations physiologiques. PUG de Grenoble.
- PENRY, D.L. & FROST, B.W. (1990).** Re-evaluation of the gut-fullness (gut fluorescence) method for inferring ingestion rates of suspension-feeding copepods. *Limnol. Oceanogr.*, 35, 1207-1214.

- PENRY, D.L. & FROST, B.W. (1991).** Chlorophyll *a* degradation by *Calanus pacificus*: dependence on ingestion rate and digestive acclimation to food resources. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 147-159.
- PERRY, G.J., VOLKMAN, J.K., JOHNS, R.B. & BOVOR, H.J. Jr. (1979).** Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43, 1715-1725.
- PERSOONE, G., SORGELOOS, P., GROLIERE, C. & OMALY, N. (1968).** Sur la limnologie de quelques lacs du Puy-de-Dôme : physico-chimie et plancton de surface. *Ann. Stat. Biol. Besse-en-Chandesse*, 3, 43-114.
- PETERSON, W.T. & DAM, H.G. (1996).** Pigment ingestion and egg production rates of the calanoid copepod *Temora longicornis*: implications for gut pigment loss and omnivorous feeding. *J. Plankton Res.*, 18(5), 855-861.
- PHLEGER, C.F., NICHOLS, P.D. & VIRTUE, P. (1998).** Lipids and trophodynamics of Antarctic zooplankton. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 120, 311-323.
- PHLEGER, C.F., NELSON, M.M., MOONEY, B.D. & NICHOLS, P.D. (2002).** Interannual and between species comparison of the lipids, fatty acids and sterols of Antarctic krill from the US AMLR Elephant Island survey area. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 131, 733-747.
- PIONETTI, J.M., QUESSADA, H., SPIELMANN, H., AUSHER, F. & BATIQUE, O. (1986).** Efficience des chaînes trophiques produites en milieu naturel sur la croissance des larves de loup *Dicentrarchus labrax* : influence des acides gras polyinsaturés. *Océanis*, 12, 261-272.
- PIROCCHI, L. (1947).** Struttura e vicenda delle biocenosi mesoplan tiche del lago Maggiore. *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 3, 59-119.

- POHL, P. (1982).** Lipids and fatty acids of microalgae. *CRC handbook of biosolar resources*, 1, 383-404.
- POHL, P. & ZURHEIDE, F. (1979).** Fatty acids and lipids of marine algae and the control of their biosynthesis by environmental factors. In : Hoppe, H.A., Leuring, T. & Tanaka, Y. (eds) *Marine algae in pharmaceutical science*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, 309p.
- POND, D.W., BELL, M.V., HARRIS, R.P. & SARGENT, J.R. (1998).** Microplanktonic polyunsaturated fatty acids markers : a mesocosm trial. *Estuar. Coast. Shelf*, 46, 61-67.
- PONT, D. (1995).** Le zooplancton herbivore dans les chaînes alimentaires pélagiques. In : Masson (eds) *Limnologie Générale*, Paris, p.515-540.
- PORTER, K.G. (1977).** The plant-animal interface in freshwater ecosystems. *American Scientist*, 65, 159-170.
- PORTER, K.G. & FEIG, Y.S. (1980).** The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25(5), 943-948.
- POULET, S.A. (1983).** Factors controlling utilization of non-algal diets by particles-grazing copepods. A review. *Oceanol. Acta*, 6, 221-234.
- POURRIOT, R. & CHAMP, P. (1982).** Consommateurs et production secondaire. In : Pourriot, R., Capblancq, J., Champ, P. & Meyer, J.A. (eds). *Ecologie du plancton des eaux continentales*. Paris, Masson, p.49-112.
- PREPAS, E. (1978).** Sugar-frosted Daphnia: An improved fixation technique for Cladocera. *Limnol. Oceanogr.*, 23, 557-559.
- PSENNER, R. & ZAPF, F. (1990).** High mountain lakes in the Alps : peculiarities and biology. In : Johannessen, M., Mosello, R. & Barth, H. (eds) *Acidification processes in remote mountain lakes. Air pollution research report 20*, Commission of the European Communities, Brussels, p.22-37.

- McQUEEN, D.J., POST, J.R. & MILLS, E.L. (1986).** Trophic relationships in freshwater pelagic ecosystems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 1571-1581.
- QUIBLIER-LLOBERAS, C. (1994).** Relations trophiques phyto-zooplankton en milieu lacustre: Intérêts des pigments comme marqueurs organiques. *Thèse de Doctorat de l'Université Blaise Pascal*, 202p.
- QUIBLIER, C., BOURDIER, G., AMBLARD, C. & PEPIN, D. (1994).** Separation of phytoplanktonic pigments by HPLC for the study of phyto-zooplankton trophic relationships. *Aquat. Sci.*, 56/1, 29-39.
- QUIBLIER-LLOBERAS, C., BOURDIER, G. & AMBLARD, C. (1996a).** A qualitative study of zooplankton grazing in an oligo-mesotrophic lake using phytoplanktonic pigments as organic markers. *Limnol. Oceanogr.*, 41(8), 1767-1779.
- QUIBLIER-LLOBERAS, C., BOURDIER, G., AMBLARD, C. & PEPIN, D. (1996b).** Impact of grazing on phytoplankton in Lake Pavin (France): contribution of different zooplankton groups. *J. Plankton Res.*, 18, 305-322.
- RAVEN, J.A. (1997).** Phagotrophy in phototrophs. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 198-205.
- RAVERA, O. (1955).** Seasonal variation of the reproductive rate in the pelagic copepods of Lake Maggiore. *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 12, 436-446.
- RAVID, T., TIETZ, A., KHAYAT, M., BOEHM, E., MICHELIS, R. & LUBZENS, E. (1999).** Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus* (De Haan). *J. Exp. Biol.*, 202(13), 1819-1829.
- RECHE, I. (1995).** Análisis de las conexiones entre el flujo de carbono y el reciclado de nutrientes en un sistema oligotrófico. *PhD. Thèse de l'Université de Grenade, Espagne*, 186p.
- RECHE, I., PUGNETTI, A., CRUZ-PIZARRO, L. & CARRILLO, P. (1996).** Relationship between bacteria and phytoplankton in a high-mountain lake : Importance of the

organic carbon released by pelagic algae for bacterioplankton. *Arch. Hydrobiol. Spec. Issue Advanc. Limnol.*, 48, 31-38.

RECHE, I., CARRILLO, P. & CRUZ-PIZARRO, L. (1997). Influence of metazooplankton on interactions of bacteria and phytoplankton in an oligotrophic lake. *J. Plankton Res.*, 19, 631-646.

RECHE, I., PULLIDO-VILLENA, E., CONDE-PORCUNA, J.M., & CARRILLO, P. (2001). Photoreactivity of dissolved organic matter from high mountain lakes of Sierra Nevada (Spain). *Arct. Antarct. Alp. Res.*, 33, 426-434.

REITAN, K.I., RAINUZZO, J.R. & OLSEN, Y. (1994). Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. *J. Phycol.*, 30, 972-979.

REUSS, N. & POULSEN, L.K. (2002). Evaluation of fatty acids as biomarkers for a natural plankton community. A field study of a spring bloom and a post-bloom period off West Greenland. *Mar. Biol.*, 141, 423-434.

REY, J. & CAPBLANCQ, J. (1975). Dynamique des populations et production du zooplancton du lac de Port-Bielh (Pyrénées Centrales). *Annals Limnol.*, 11(1), 1-45.

REY, C., CARLOTTI, F., TANDE, K. & HYGUM, B.H. (1999). Egg and faecal pellet production of *Calanus finmarchicus* females from controlled mesocosms and *in situ* populations : influence of age and feeding history. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 188, 133-148.

REYNOLDS, C. (1984). The ecology of freshwater phytoplankton. *Cambridge University Press, Cambridge*, 384p.

RICHARDSON, K., JÓNASDÓTTIR, S.H., HAY, S.J. & CHRISTOFFERSEN, A. (1999). *Calanus finmarchicus* egg production and food availability in the Faroe-Shetland channel and Northern North Sea : October-March. *Fish. Oceanogr.*, 8, 153-162.

RIDOUT, P.S. & MORRIS, R.J. (1988). Further studies of short-term variation in the pigment composition of a spring phytoplankton bloom. *Mar. Biol.*, 97, 597-602.

- RIOUAL, P. (2000).** Diatom assemblages and water chemistry of lakes in the French Massif Central : a methodology for reconstruction of past limnological and climate fluctuations during the eemian period. *Thèse de Doctorat de l'University College of London*, 460p.
- ROBINSON, N., CRANWELL, P.A., EGLINTON, G. & JAWORSKI, G.H.M. (1987).** Lipids of four species of freshwater dinoflagellates. *Phytochem.*, 26, 411-421.
- ROEN, U. (1957).** Contribution to the biology of some Danish freeliving freshwater Copepods. *Biol. Skr.*, 9, 1-101.
- ROFF, J.C., TURNER, J.T., WEBBER, M.K. & HOPCROFT, R.R. (1995).** Bacterivory by tropical copepod nauplii: extend and possible significance. *Aquat. Microb. Ecol.*, 9, 165-175.
- ROLOFF, B. & NICKLISCH, A. (1993).** Partitioning of phosphate between blue-green algae and their accompanying bacteria in phosphate-limited. *Arch. Hydrobiol.*, 126, 405-416.
- ROMAN, R.M., DUCKLOW, H.W., FUHRMAN, J.A., GARSIDE, C., GLIBERT, P.M., MALONE, T.C. & McMANAUS, G.B. (1988).** Production, consumption and nutrient cycling in a laboratory mesocosm. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 42, 39-52.
- ROTHHAUPT, K.O. (1992).** Stimulation of phosphorus-limited phytoplankton by bacterivorous flagellates in laboratory experiments. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 750-759.
- ROTHHAUPT, K.O. (1996).** Laboratory experiments with a mixotrophic chrysophyte and obligately phagotrophic and phototrophic competitors. *Ecology*, 77, 716-724.
- ROTHHAUPT, K.O. (1997).** Nutrient turnover by freshwater bacterivorous flagellates : Differences between a heterotrophic and a mixotrophic chrysophyte. *Aquat. Microb. Ecol.*, 12, 65-70.
- ROTT, E. (1988).** Some aspects of the seasonal distribution of flagellates in mountain lakes. *Hydrobiol.*, 45, 159-170.

- ROY, S. & POULET, S.A. (1990).** Laboratory study of the chemical composition of aging copepod fecal material. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 135, 3-18.
- RUNGE, J.A. & PLOURDE, S. (1996).** Fecundity characteristics of *Calanus finmarchicus* in coastal waters of Eastern Canada. *Ophelia*, 44, 171-187.
- SAIZ, E., CALBET, A., IRIGOIEN, X., ALCARAZ, M. (1999).** Copepod egg production in the western Mediterranean : response to food availability in oligotrophic environments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 187, 179-189.
- SALIOT, A. (1994).** Biogéochimie organique marine. Notes de cours. *Océanis*, 20, 197p.
- SANTER, B. (1994).** Influences of food type and concentration on the development of *Eudiaptomus gracilis* and implications for interactions between calanoid and cyclopoid copepods. *Arch. Hydrobiol.*, 131, 141-159.
- SARGENT, J.R. (1976).** The structure, metabolism and function of lipids in marine organisms. In : Malins, D.C. & Sargent, J.R. (eds) *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology*, Vol. 3, academic Press, London, p.149-212.
- SARGENT, J.R., GATTEN, R.R., CORNER, E.D.S. & KILVINGTON, C.C. (1977).** On the nutrition and metabolism of zooplankton. Lipids in *Calanus helgolandicus* grazing *Biddulphia sinensis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 57, 525-533.
- SARGENT, J.R. & WHITTLE, K.J. (1981).** Lipids and hydrocarbons in the marine food web. In : Longhurst, A.R. (eds) *Analysis of marine ecosystems*, p.491-533.
- SARGENT, J.R. & HENDERSON, R.J. (1986).** Lipids. In : Corner, E.D.S. & O'Hara, S.C.M. (eds), *The Biological Chemistry of Marine Copepods*, Clarendon, Oxford, p. 59-108.
- SARGENT, J.R., PARKES R.J., MUELLER HARVEY, I. & HENDERSON, J. (1987).** Lipid biomarkers in marine ecology. In: Sleigh, M.A. (eds), *Microbes in the sea*. Ellis Horwood, Chicester, p.54-64.

- SARGENT, J.R. & FALK-PETERSEN, S. (1988).** The lipid biochemistry of calanoid copepods. *Hydrobiol.*, 167/168, 101-114.
- SARGENT, J.R., BELL, M.V. & HENDERSON, R.J. (1995).** Protists as sources of (n-3) polyunsaturated fatty acids for vertebrate development. *Protistological Actualities, Proceedings of the 11nd European Congress Protist.*, 54-64.
- SATTLER, B. (1998).** Bakterioplankton und Heterotrophe Nanoflagellaten. In : Sommaruga-Wögrath (eds), *Versauerung von Hochgebirgsseen. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft*, p.83-101.
- SCHABETSBERGER, R. & JERSABEK, C.D. (2004).** Shallow males, deep females: sex-biased differences in habitat distribution of the freshwater calanoid copepod *Arctodiaptomus alpinus*. *Ecography*, 27(4), 506-520.
- SCHAGERL, M., PICHLER, C. & DONABAUM, K. (2003).** Patterns of major photosynthetic pigments in freshwater algae. 2. Dinophyta, Euglenophyta, Chlorophyceae and Charales. *Ann. Limnol. – Int. J. Lim.*, 39(1), 49-62.
- SCHNACK, D. & BÖTTGER, R. (1981).** Interrelation between invertebrate plankton and larval fish development in the Schlei fjord, western Baltic. *Kieler Meeresforsch, Sondern*, 5, 202-210.
- SCHNACK-SCHIEL, S.B. & HAGEN, W. (1994).** Life cycle strategies and seasonal variations in distribution and population structure of four dominant calanoid copepod species in the eastern Weddel Sea, Antarctica. *J. Plankton Res.*, 16(11), 1543-1566.
- SCOTT, C.L., KWASNIESKI, S., FALK-PETERSEN, S. & SARGENT, J.R. (2002).** Lipids and fatty acids in the copepod *Jaschnovia brevis* (Jaschnov) and in particulates from Arctic waters. *Polar Biol.*, 25, 65-71.

- SCRIBE, P., FILLAUX, J., LAUREILLARD, J., DENANT, V. & SALIOT, A. (1991).** Fatty acids as biomarkers of planktonic inputs in the stratified estuary of the Krka river, Adriatic Sea : relationship with pigments. *Mar. Chem.*, 32, 299-312.
- SHUMAN, F.R. & LORENZEN, C.J. (1975).** Quantitative degradation by marine herbivore. *Limnol. Oceanogr.*, 20, 580-586.
- SICKO-GOAD, L., SIMMONS, M.L., LAZINSKY, D. & HALL, J. (1988).** Effect of light cycle on diatom fatty acid composition and quantitative morphology. *J. Phycol.*, 24, 1-7.
- SMITH, S.L. & LANE, P.V.Z. (1985).** Laboratory studies of the marine copepod *Centropages typicus* : egg production and development rates. *Mar. Biol.*, 85, 153-162.
- SOMMER, U., GLIWICZ, Z.M., LAMPERT, W. & DUNCAN, A. (1986).** The PEG-model of seasonal succession of planktonic events in freshwater. *Arch. Hydrobiol.*, 106, 433-471.
- STACEY, L., Mc LEROY-ETHERIDGE & Mc MANUS, G.B. (1999).** Food type and concentration affect chlorophyll and carotenoid destruction during copepod feeding. *Limnol. Oceanogr.*, 44(8), 2005-2011.
- STERNER, R.W. (1990).** The ratio of nitrogen to phosphorus resupplied by herbivores : zooplankton and algal competitive arena. *Am. Nat.*, 136, 209-229.
- STERNER, R.W., CHRZANOWSKI, T.H., ELSER, J.J. & GEORGE, N.B. (1995).** Sources of nitrogen and phosphorus supporting the growth of bacterioplankton and phytoplankton in an oligotrophic Canadian Shield Lake. *Limnol. Oceanogr.*, 40, 242-249.
- STOCKNER, J.G. (1991).** Autotrophic picoplankton in freshwater ecosystems : the view from the summit. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, 76, 483-492.
- STOCKNER, J.G. & ANTIA, N.J. (1986).** Algal picoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43, 2472-2503.

- STOCKNER, J., CALLIERI, C. & CRONBERG, G. (1999).** Picoplankton and other non-bloom forming cyanobacteria in lakes. In : *Whitton, B. & Potts, M. (eds), Ecology of cyanobacteria : their diversity in time and space, Kluwer Academic Publishers.*
- STOECKER, D.K. & CAPUZZO, J.M. (1990).** Predation on Protozoa: its importance to zooplankton. *J. Plankton Res.*, 12, 891-908.
- STØTTRUP, J.G. & JENSEN, J. (1990).** Influence of algal diet on feeding and egg production of the calanoid copepod *Acartia tonsa* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 141, 87-105.
- STRAŠKRABOVÁ, V. & ŠIMEK, K. (1993).** Measurement of biomass and activity in relation to structure and function of microbial activities in plankton. *Arch. Hydrobiol. Beih., Ergebn. Limnol.*, 31, 55-60.
- STRAŠKRABOVÁ, V., CALLIERI, C., CARRILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L., FOTT, J., HARTMAN, P., MACEK, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M., NEDOMA, J. & ŠIMEK, K. (1999).** Investigations on pelagic food webs in mountain lakes – aims and methods. *J. Limnol.*, 58(2), 77-87.
- STROM, S.L., MORELLO, T.A. & BRIGHT, K.J. (1998).** Protozoan size influences algal pigment degradation during grazing. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164, 189-197.
- SYKES, P.F. & HUNTLEY, M.E. (1987).** Acute physiological reactions of *Calanus pacificus* to selected dinoflagellates : direct observations. *Mar. Biol.*, 94, 19-24.
- TACKX, M.L.M., BAKKER, C. & RIJSWIJK, P.V. (1990).** Zooplankton grazing pressure in the Oosterschelde (The Netherlands). *Netherlands J. Sea Res.*, 25, 405-415.
- TANDE, K.S. & HENDERSON, R.J. (1988).** Lipid composition of copepodite stages and adult females of *Calanus glacialis* in Arctic waters of the Barents Sea. *Polar Biol.*, 8, 333-339.

- TAYLOR, W.D. (1984).** Phosphorus flux through epilimnetic zooplankton from lake Ontario : relationship with body size and significance to phytoplankton. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1702-1712.
- TESHIMA, S. (1982).** Sterol metabolism. In : Pruder, G.D., Langdon, C.J. & Conklin, D.E. (eds) *Proceedings of the 2nd Int'l Conference Aquaculture Nutrition, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana*, p.205-216.
- TESHIMA, S. (1991).** Sterols of crustaceans, molluscs and fish. In : Patterson, G.W. & Nes, W.D. (eds) *Physiology and Biochemistry of Sterols, Am. Oil Chemist's Soc., Champaign, Illinois*, p.229-259.
- TESHIMA, S. & KANAZAWA, A. (1983).** Variation in lipid composition during the ovarian maturation of the prawn. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49(6), 957-962.
- TESHIMA, S., ISHIKAWA, M., KOSHIO, S. & KANAZAWA, A. (1997).** Necessity of dietary cholesterol for the freshwater prawn. *Fisheries Sci.*, 63, 596-599.
- THINGSTAD, T.F., SKJOLDAL, E.F. & BOHNE, R.A. (1993).** Phosphorus cycling and algal-bacterial competition in Sandsfjord, Western Norway. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 99, 239-259.
- THINGSTAD, T.F. & RASSOULZADEGAN, F. (1995).** Nutrient limitation, microbial food webs, and biological c-pumps – suggested interactions in a p-limited Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 99, 239-259.
- THINGSTAD, T.F., HAVSKUM, H., GARDE, K. & RIEMAN, B. (1996).** On the strategy of "eating your competitor" : A mathematical analysis of algal mixotrophy. *Ecology*, 77, 2108-2118.
- THINGSTAD, T.F., HAGSTRÖM, A. & RASSOULZADEGAN, F. (1997).** Accumulation of degradable DOC in surface waters : Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnol. Oceanogr.*, 42, 398-404.

- THOUMELIN, G., BODINEAU, L. & WARTEL, M. (1997).** Origin and transport of organic matter across the microtidal Seine estuary : fatty acids and sterols variations. *Mar. Chem.*, 58(1-2), 59-71.
- THYS, I., LEPORCQ, B. & DESCY, J.P. (2003).** Seasonal shifts in phytoplankton ingestion by *Daphnia galeata*, assessed by analysis of marker pigments. *J. Plankton Res.*, 25(12), 1471-1484.
- TILZER, M. (1972).** Dynamik und Produktivität von Phytoplankton und pelagischen Bakterien in einem Hochgebirgssee (Vorderer Finstertaler See, Österreich). *Arch. Hydrobiol. Suppl.*, 40, 201-273.
- TILZER, M. & SCHWARTZ, K. (1976).** Seasonal and vertical patterns of phytoplankton light adaptation in high mountain lake. *Arch. Hydrobiol.*, 77, 488-504.
- TIRELLI, V. & MAYZAUD, P. (1998).** Gut pigment destruction by the copepod *Acartia clausi*. *J. Plankton Res.*, 20, 1953-1961.
- TRONCZYNSKY, J., MARTY, J.C., SCRIBE, A., LORRE, A. & SALIOT, A. (1985).** Marqueurs chimiques indicateurs des activités microbiologiques: cas des acides gras dans l'estuaire de la Loire. *Océanis*, 11, 399-408.
- TSUJI, T., OHKI, K. & FUGITA, Y. (1986).** Determination of photosynthetic pigment composition in an individual phytoplankton cell in seas and lakes using fluorescence microscopy properties of the fluorescence emitted from picoplankton cells. *Mar. Biol.*, 93, 343-349.
- TURNER, J.T. & TESTER, P.A. (1992).** Zooplankton feeding ecology – bacterivory by metazoan microzooplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 160(2), 149-167.
- UCHIMA, M. & HIRANO, R. (1988).** Swimming behaviour of the marine copepod *Oithona davisae* : internal control and search for environment. *Mar. Biol.*, 99(1), 47-56.

- UTHERMÖHL, H. (1958).** Zur Vervollkommung der quantitativen phytoplankton Methodik. *Mitt. Intern. Ver. Limnol.*, 9, 1-38.
- UYE, S. (1981).** Fecundity studies of neritic calanoid copepods *Acartia clausi* Giesbrecht and *A. steueri* Smirnov: A simple empirical model of daily egg production. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 50, 255-271.
- VANDERPLOEG, H.A., CVALETT, J.F., LIEBIG, J.R. & GARDNER, W.S. (1998).** *Limnocalanus macrurus* (Copepoda : Calanoida) retains a marine arctic lipid and life cycle strategy in Lake Michigan. *J. Plankton Res.*, 20(8), 1581-1597.
- VAN DONK, E., LÜRLING, M., HESSEN, D.O. & LOKHORST, G.M. (1997).** Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact to grazers. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 357-364.
- VERA, A. (2001).** Les lipides d'*Acanthodiaptomus denticornis* (Copepoda : Calanoida) en relation avec son environnement trophique potentiel dans deux lacs d'altitude du Massif Central français. *D.E.A. des Universités Paul Sabatier, Blaise Pascal et Montpellier II*, 33p.
- VERA, A., DESVILETTES, C., BEC, A. & BOURDIER, G. (2001).** Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates : An experimental study. *Aquat. Microb. Ecol.*, 25, 271-279.
- VERITY, P.G., ROBERSON, C.Y., TRONZO, C.R., ANDREWS, M.G., NELSON, J.R. & SIERAKI, M.E. (1992).** Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 37, 1434-1446.
- VERITY, P.G. & PAFFENHOFER, G.A. (1996).** On assessment of prey ingestion by copepods. *J. Plankton Res.*, 18, 1767-1779.
- VILLAR-ARGAIZ, M., MEDINA-SÁNCHEZ, J.M. & CARRILLO, P. (2002).** Microbial plankton response to contrasting climatic conditions : Insights from community structure, productivity and fraction stoichiometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, 29, 253-266.

- VOLKMAN, J.K. (1986).** A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.*, 9(2), 83-99.
- VOLKMAN, J. K. (2003).** Sterols in microorganisms. *Applied Microb. and Biotechnol.*, 60, 495-506.
- VOLKMAN, J. K. (2005).** Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org. Geochem.*, 36, 139-159.
- VOLKMAN, J.K. & JOHNS, R.B. (1977).** The geochemical significance of positional isomers of unsaturated acids from an intertidal zone sediment. *Nature*, 267, 693-694.
- VOLKMAN, J.K., EGLINTON, G. & CORNER, E.D.S. (1980a).** Sterols and fatty acids of the marine diatom *Biddulphia sinensis*. *Phytochem.*, 19, 1809-1813.
- VOLKMAN, J.K., JOHNS, R.B., GILLAN, F.T., PERRY, G.J. & BAVOR, H.J. Jr. (1980b).** Microbial lipids of an intertidal sediment. I. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 44, 1133-1143.
- VOLKMAN, J.K., SMITH, D.J., EGLINTON, T.E.V., FORSBERG, G. & CORNER, E.D.S. (1981).** Sterol and fatty acid composition of four marine Haptophyceae algae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 61, 509-527.
- VOLKMAN, J.K., ALLAN, D.I., STEVENSON, P.L. (1986).** Bacterial and algal hydrocarbons in sediments from a saline Antarctic lake, Ace lake. *Org. Geochem.*, 10(4-6), 671-681.
- VOLKMAN, J.K., JEFFREY, S.W., NICHOLS, P.D., ROGERS, G.I. & GARLAND, C.D. (1989).** Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Ecol.*, 128, 509-527.
- VOLKMAN, J.K., BARRETT, S.M., BLACKBURN, S.I., MANSOUR, M.P., SIKES, E.L. & GELIN, F. (1998).** Microalgal biomarkers : A review of recent research development. *Org. Geochem.*, 29, (57), 1163-1179.

- VON ELERT, E. & STAMPFL, P. (2000).** Food quality for *Eudiaptomus gracilis* : the importance of particular highly unsaturated fatty acids. *Freshwater Biol.*, 45, 189-200.
- VON ELERT, E. (2002).** Determination of limiting fatty acids in *Daphnia galeata* using a new method to enrich food algae with single fatty acids. *Limnol. Oceanogr.*, 47, 1764-1773.
- VREDE, K. (1996).** Regulation of bacterioplankton production and biomass in an oligotrophic Clearwater lake – the importance of the phytoplankton community. *J. Plankton Res.*, 18, 1009-1032.
- WELSCHMEYER, N.A., GOERICKE, R., STROM, S. & PETERSON, W. (1991).** Phytoplankton growth and herbivory in the subarctic Pacific : A chemotaxonomic analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 36, 1631-1649.
- WHITE, D.C., BOBBIE, R.J., NICKELS, J.S., FAZIO, S.D. & DAVIS, W.M. (1980).** Non selective biochemical methods for the determination of fungal mass and community structure in estuarine microflora. *Bot. Mar.*, 23, 239–250.
- WILLE, A., SONNTAG, B., SATTLER, B. & PSENNER, R. (1999).** Abundance, biomass and size structure of the microbial assemblage in the high mountain lake Gossenköllesee (Tyrol, Austria) during the ice-free period. *J. Limnol.*, 58(2), 117-126.
- WIMPENNY, R.S. (1938).** Diurnal variation in the feeding and breeding of zooplankton related to the numerical balance of the zoo-phyto-plankton community. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, 13, 323-337.
- WINDER, M., BÜRGI, H.S. & SPAAK, P. (2003).** Mechanisms regulating zooplankton populations in a high-mountain lake. *Freshwat. Biol.*, 48, 795-809.
- WOUTERS, R., MOLINA, C., LAVENS, P. & CALDERON, J. (1999).** Contenido de lípidos y vitaminas en reproductores silvestres durante la maduración ovárica y en nauplios de *Penaeus vannamei*. *Proceedings of the Fifth Ecuadorian Aquaculture Conference, Guayaquil, Ecuador, Fundación CENAIM-ESPOL, CDRom.*

- WRIGHT, S.W. & SHEARER, J.D. (1984).** Rapid extraction and HPLC of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J. Chromatogr.*, 294, 281-285.
- WRIGHT, S.W., JEFFREY, S.W., MANTOURA, R.F.C., LLEWELLYN, C.A., BJORNLAND, T., REPEAT, D. & WELSCHMEYER, N. (1991).** Improved HPLC method of the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 77, 183-196.
- XU, X.L., JI, W.L., CASTELL, J.D. & O'DOR, R.K. (1994).** Influence of dietary lipid sources on fecundity, egg hatchability and fatty acid composition of Chinese prawn (*Penaeus chinensis*) broodstock. *Aquacult.*, 119, 359-370.
- ZÁNKAI, N.P. (1991).** Feeding of nauplius stages of *Eudiaptomus gracilis* on mixed plastic beads. *J. Plankton Res.*, 13, 437-453.
- ZAPATA, M. & GARRIDO, J.L. (1991).** Influence on injection conditions in reversed-phase high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids. *Chromatographia*, 31, 589-594.
- ZAPATA, M., RODRÍGUEZ, F. & GARRIDO, J.L. (2000).** Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton : a new HPLC method using a reversed phase C₈ column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 195, 29-45.
- ZHUKOVA, N.V. & KHARLAMENKO, V.I. (1999).** Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat. Microb. Ecol.*, 17, 153-157.

ANNEXES

Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates: an experimental study

Aurélien Véron, Christian Desvilettes*, Alexandre Bec, Gilles Bourdier

¹Laboratoire de biologie des protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière Cedex, France

ABSTRACT: The fatty acid compositions of 5 freshwater heterotrophic flagellates were studied using laboratory cultures. The flagellates *Bodo saltans*, *Paraphysomonas vestita*, *Spumella pudica*, *Polytoma uvella* and *Chilomonas paramecium* were cultured on Synura medium enriched either with Régilait milk powder (MP medium; Régilait, St Martin Roche, France) or with Tabimin dry fish food (DFF medium; Tetra, Melle, France). The bacteria present in the culture media were also analyzed. The enrichment substrate was found to have a pronounced influence on the fatty acid profiles of the organisms. For example, flagellates grown on the MP medium were characterized by very low contents of polyunsaturated fatty acids (PUFA; 1.28 to 5.50% of total fatty acids), whereas those grown on DFF medium contained up to 13.20% PUFA. Irrespective of the species studied, the dominant PUFA were those of the (n-6) series. The presence of branched uneven-numbered fatty acids and of 18:1(n-7) within the protozoans reflects an intensive bacterivorous activity that is understandable in phagotrophic species such as *B. saltans*, *P. vestita* and *S. pudica* but is debatable in *C. paramecium* and *P. uvella*, as these species have been described as osmotrophic. The heterotrophic flagellates in this study seemed to have varying, but rather limited, capacities of PUFA biosynthesis and bioconversion that were partly related to the physicochemical conditions in the cultures (temperature and dissolved oxygen) and to the phylogenetic relations of the organisms. Species containing a leucoplast or a residual plastid reproduced in a very attenuated manner the characteristic PUFA profiles of autotrophic flagellates belonging to their taxonomic group. This was mainly the case for *C. paramecium* and *P. uvella*. Finally, our results suggest that in the natural environment, the PUFA contents of picoplanktonic prey and of dissolved organic matter are the main factors influencing the PUFA content of these flagellates.

KEY WORDS: Heterotrophic nanoflagellates · Fatty acids · Microbial loop · PUFA

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

In both marine and freshwater ecosystems, obligate heterotrophic flagellates are known to contribute significantly to the food of mesozooplankton, transferring energy from the microbial loop to higher trophic levels (Stoecker & McDowell Capuzzo 1990, Burns & Schallenberg 1996). These protozoans can feed on a large spectrum of particles including small detritus, bacteria, and pico- and nanoplanktonic organisms (Goldman & Dennet 1990), although some of them can satisfy their energy needs by osmotrophy (Sleigh 2000). This trans-

fer of organic matter from small particles to rotifers or microcrustacea constitutes trophic repackaging and thus makes the fraction of primary production produced by pico- and nanophytoplankton (Gifford 1991) accessible to zooplankton.

However, the predation by metazoans on heterotrophic flagellates can be highly selective (Sanders & Whickham 1993), perhaps as the content of essential compounds varies greatly from 1 taxonomic group to another (Klein Breteler et al. 1999). Among these compounds, fatty acids (FAs) and especially highly unsaturated FAs are important for the development of zooplankton (Arts 1998). Heterotrophic flagellates may therefore contribute to the trophic transfer of unsaturated FAs, a role that is fulfilled mainly by consumption

*Corresponding author.

E-mail: christian.desvilettes@univ-bpclermont.fr

of microalgae (Sargent et al. 1995). Unfortunately, data concerning the FA composition of heterotrophic flagellates are scarce and they suggest that these organisms have different FA synthesis capabilities (Erwin 1973, Wood 1988). At present, we know that the marine heterotrophic dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* and marine bodonids can produce DHA (22:6, n-3) (Harrington & Holz 1968, Barclay et al. 1994, Zhukova & Kharlamenko 1999). For freshwater organisms, information is even more scanty and restricted to the results obtained from batch cultures (Beach et al. 1970). In any case, the absence of any monospecific proliferations of heterotrophic flagellates in lake environments forces the use of laboratory cultures to determine the highly unsaturated FA composition of these protists (Desvillettes et al. 1997).

Furthermore, it has been clearly established that some groups of heterotrophic flagellates are derived from autotrophic plastid-containing forms (Cavalier Smith 2000), so it may be that these heterotrophic forms have inherited the PUFA bioconversion capabilities of autotrophs. Phrased another way: can the concept of taxonomic biomarkers applied to some PUFA that are representative of a given group of autotrophic flagellates (Harrington et al. 1970, Ahlgren et al. 1992, Zhukova & Aizdaicher 1995) be applied to corresponding obligate heterotroph forms?

The aim of this study was to analyze the FA composition of several free-living obligate heterotrophic flagellates representative of the main freshwater taxonomic groups. We focused on organisms in genera with both autotrophic and heterotrophic forms in lakes. We therefore chose the kinetoplastid *Bodo saltans*, often associated with particulate organic matter in the water column (Patterson et al. 1993), the chrysomonads *Paraphysomonas vestita* and *Spumella pudica*, which are characteristic of freshwater communities (Laybourn Parry & Parry 2000), and the volvocid *Polytoma uvella* and the cryptomonad *Chilomonas paramecium*, which are occasionally abundant in freshwater (Arndt et al. 2000). To determine the influence of the quality of dissolved organic matter on the FA profiles of these protozoans, we used a culture medium enriched in 2 ways.

MATERIALS AND METHODS

Culture conditions. Flagellate strains were obtained from Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) (Windermere and Oban, UK) or from our laboratory collection (*Bodo saltans* and *Chilomonas paramecium*). Among the tested species, *Spumella pudica* and *Paraphysomonas vestita* had a mean diameter of 7 to 8 μm . The ovoid cells of *B. saltans* and *Polytoma uvella* were,

respectively, 9 and 15 μm long, while the largest species, *C. paramecium*, was around 35 μm long. All the flagellates studied were grown in Synura medium (Provasoli & Pintner 1960) enriched in one experiment with Régilait milk powder (MP; Régilait, St Martin Roche, France) and in the other with Tabimin dry fish food (DFF; Tetra, Melle, France). The amount of the added nutrient was 0.5 mg ml⁻¹. Each culture was conducted in triplicates in 2 l Erlenmeyer flasks filled with 800 ml of Synura medium. Flasks were inoculated with 3 d old organisms to give an initial density of approximately 10³ to 10⁴ cells ml⁻¹. The cultures were incubated at 20°C under a photoperiod of 12:12 h light:dark, and they were not shaken or aerated. To characterize the FA composition of the bacteria developing in the flagellate cultures, 2 cultures of bacteria alone were concurrently grown in triplicate in the same Synura medium enriched with MP or DFF.

Flagellates were harvested at the beginning of the stationary phase after 72 to 120 h of incubation, depending on the species grown. Bacterial cultures were stopped after 4 d of incubation and harvested.

Sampling. To avoid contamination of the samples with residual nutrients (MP or DFF), the upper 700 ml of the cultures was gently siphoned off into a clean flask, while the bottom layer (100 ml) was discarded. Flagellates were separated from bacteria by centrifugation (4 min at 500 \times g) and by washing the phases with Volvic™ water. Then flagellates were recovered by filtration on pre-combusted GF/F glass-fiber filters. Bacterial contamination of the filters was checked by counting flagellate and bacterial cells in the washed extract of culture before and after filtration. Siphoned cultures of bacteria alone were also filtered on GF/F filters.

Lipid analysis. Lipids were analysed on flagellate filters, bacterial filters and 3 samples of each nutrient (MP and DFF). Total lipids were extracted with chloroform-methanol according to the method of Folch et al. (1957). FA methyl esters were prepared from the lipid extract by hydrolysis in methanolic NaOH and esterification in methanolic H₂SO₄ (Desvillettes et al. 1997). Gas chromatographic analyses were carried out on a Chrompack CP 9001 gas chromatograph equipped with a CP wax 58 column (Varian SA, les Ulis, France) (25 \times 0.32 m internal diameter) or with an SPB-1 column (Supelco, Sigma-Aldrich, St Quentin, France) (30 \times 0.25 m internal diameter). We used a split-splitless injection system with helium as carrier gas. The oven was programmed to rise from an initial temperature of 160 to 240°C at a rate of 2.5°C min⁻¹ with the FFAP column. When the SPB-1 column was used, samples were injected at an oven temperature of 150°C, and after 4 min the temperature was raised to 250°C at a rate of 4°C min⁻¹. Individual FA methyl esters were identified by comparing retention times with those

obtained from Supelco standards and laboratory standards. FA methyl esters were quantified using 23:0 as internal standard added just before derivatization of FAs.

Statistical analysis. The differences for each FA between flagellate species, bacteria and nutrient were tested using a 1-way ANOVA followed by the Scheffé test. The data from analysis of FAs were also subjected to a normalized principal component analysis.

RESULTS

Flagellate growth

The growth of flagellate species in the conditions described in materials and methods is shown in Fig. 1. *Spumella pudica* and *Bodo saltans* exhibited a similar growth in both nutrient conditions (MP medium and DFF medium). *Polytoma uvella* failed to grow in DFF medium, while in the same medium, the growth of *Chilomonas paramecium* and *Paraphysomonas vestita* was faster than in MP medium. The number of *P. vestita* cells after 96 h of incubation increased markedly in MP medium by the multiplication of small cell forms (Fig. 1). This observation was followed by a large decrease, which led us to harvest the flagellates. Sudden proliferation of small heterotrophic chrysomonad cells in culture is known to precede strong declines and cyst formation, a phenomenon attributed to the lack of bacterial prey linked to nutrient limitation (Zubkov & Sleigh 1995).

FA composition of bacteria and nutrient sources (MP and DFF)

The predominant FAs in the MP medium (Table 1) were saturated 16:0 (50.6% of total), 18:0 (7.06%) and 14:0 (6.65%), and monounsaturated 18:1(n-9) (9.74%) and 16:1(n-7) (8.14%). The major PUFA detected was 18:2(n-6), but the MP substrate lacked long chain PUFA, with the exception of 22:2(n-6). The FA profile of bacteria grown in the MP medium was similar to that of MP (Table 1). The dominant FAs were also saturated 16:0, 18:0 and 14:0, but typical bacterial FAs lacking in the substrate were found in bacteria samples. These FAs were *cis*-vaccenic FA (18:1n-7, 7.28% of the total) and branched FAs such as *iso* and *anteiso* 15:0 and 17:0 (total amount >3%, see Table 1).

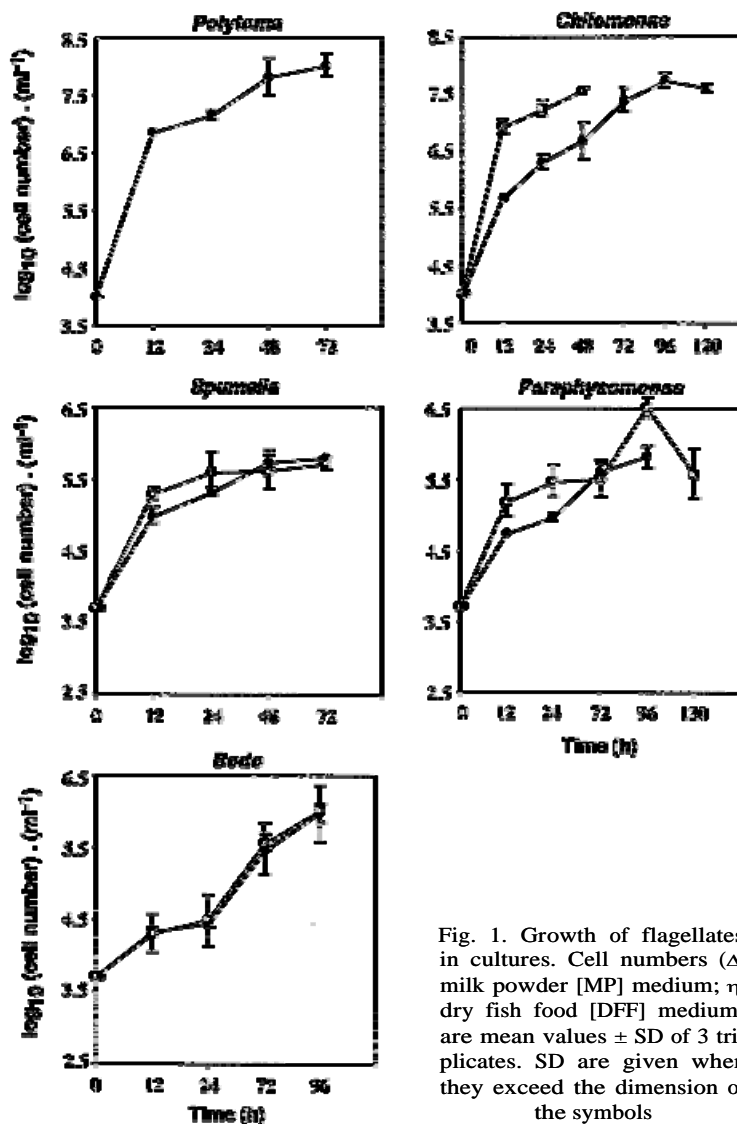


Fig. 1. Growth of flagellates in cultures. Cell numbers (Δ : milk powder [MP] medium; \square : dry fish food [DFF] medium) are mean values \pm SD of 3 triplicates. SD are given when they exceed the dimension of the symbols

In contrast to MP, the DFF substrate was characterized by high percentages of PUFA (32.02% of the total) occurring at concentrations similar to those of saturated FAs (33.50%; Table 2). These PUFA were dominated by 18:2(n-6) (20.70%) and 22:6(n-3) (4.32%), and to a lesser extent by 18:3(n-3) and 20:5(n-3). Bacteria grown in DFF medium had a quite different composition from those grown in the enrichment substrate (Table 2). The most notable features were the presence of large amounts of branched FAs, making up 23.61% of total, and the high percentages of 16:1(n-7) and 18:1(n-7). The absence of large amounts of PUFA in these bacteria is also a specific trend, and PUFA were almost exclusively limited to (n-6) acids (3.23% in total). Finally, there were several significant differences ($p < 0.05$) between bacteria grown in MP medium and bacteria grown in DFF medium (Table 3). This observation concerns dom-

Table 1. Fatty acid composition (wt %) of total lipid from flagellates grown in Synura medium enriched with milk powder (MP). Data are weight percentage of total fatty acids and are mean \pm SD (n = 3). ai: anteiso fatty acids; i: iso fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; n: number of culture flasks (bacteria or flagellates) or samples (MP) analyzed; (n-3)/(n-6): ratio of total (n-3) and total (n-6) fatty acids; 'Others' includes components not firmly identified or of a lesser interest: 6:0, 8:0, 10:0 2-OH?, 12:0 2-OH?, 15:1(n-7), 17:1(n-8)?, 16:2(n-7)?, 18:1(n-5)?, 18:2(n-7), 19:0, 19:1?; PUFA: polyunsaturated fatty acids; Σ (n-3) and Σ (n-6): total fatty acids of (n-3) and (n-6) series; SAFA: saturated fatty acids; Σ Br.FA: sum of branched fatty acids; Tr: traces <0.2%

Fatty acids	MP	Bacteria	<i>Bodo saltans</i>	<i>Spumella pudica</i>	<i>Paraphysomonas vestita</i>	<i>Polytoma uvella</i>	<i>Chilomonas paramecium</i>
10:0	1.18 \pm 1.16	0.95 \pm 1.00	Tr	0.38 \pm 0.35	0.80 \pm 0.44	0.93 \pm 0.76	0.63 \pm 0.42
12:0	1.99 \pm 1.88	0.39 \pm 0.23	0.99 \pm 0.18 ^a	0.96 \pm 0.31	1.68 \pm 0.62	2.38 \pm 0.85 ^a	1.88 \pm 0.69 ^a
13:0	–	Tr	Tr	0.58 \pm 0.30 ^a	2.53 \pm 1.37 ^a	0.39 \pm 0.19	0.59 \pm 0.60
14:0	6.65 \pm 4.19	6.83 \pm 3.81	3.20 \pm 5.54	6.08 \pm 0.76	8.30 \pm 0.01	11.78 \pm 0.98 ^a	10.32 \pm 2.00
15:0	0.66 \pm 0.68	1.10 \pm 0.58	0.41 \pm 0.70	0.97 \pm 0.02	1.03 \pm 0.01	1.25 \pm 0.01	1.84 \pm 0.27 ^a
16:0	50.60 \pm 29.40	38.27 \pm 19.45	40.54 \pm 3.49	32.86 \pm 3.11	34.91 \pm 0.89	35.35 \pm 1.93	38.64 \pm 5.17
17:0	0.39 \pm 0.22	0.76 \pm 0.31	0.69 \pm 0.25	1.17 \pm 0.70	0.90 \pm 0.15	0.65 \pm 0.10	1.61 \pm 0.60
18:0	7.06 \pm 4.51	9.86 \pm 2.82	10.63 \pm 1.06	7.40 \pm 2.16	7.10 \pm 0.26	8.09 \pm 1.33	7.64 \pm 3.71
20:0	Tr	0.26 \pm 0.13	Tr	Tr	Tr	0.23 \pm 0.15	0.48 \pm 0.17
22:0	Tr	Tr	Tr	0.25 \pm 0.14	Tr	Tr	0.52 \pm 0.52
24:0	Tr	1.58 \pm 1.04 ^b	Tr	0.50 \pm 0.70 ^a	0.79 \pm 1.11	Tr	0.60 \pm 1.04
i15:0	Tr	0.71 \pm 0.38 ^b	0.53 \pm 0.47	0.78 \pm 0.37	1.31 \pm 0.17	0.39 \pm 0.04	0.43 \pm 0.12
ai15:0	Tr	0.67 \pm 0.37	1.18 \pm 0.24	0.45 \pm 0.01	0.67 \pm 0.07	0.36 \pm 0.03	0.67 \pm 0.22
i16:0	–	0.27 \pm 0.29	Tr	0.34 \pm 0.01	0.35 \pm 0.02	0.25 \pm 0.22	0.57 \pm 0.14
i17:0	Tr	0.55 \pm 0.28	0.52 \pm 0.12	0.64 \pm 0.48	0.25 \pm 0.12	0.36 \pm 0.04	0.50 \pm 0.17
ai17:0	Tr	0.65 \pm 0.31 ^b	0.87 \pm 0.30	0.43 \pm 0.10 ^a	0.63 \pm 0.04	Tr	0.69 \pm 0.24
i18:0	–	0.54 \pm 0.31	Tr	–	–	Tr	–
SAFA	69.07	63.38	59.56	53.80	61.25	62.41	67.62
14:1(n-5)	0.48 \pm 0.41	Tr	1.52 \pm 0.48	0.41 \pm 0.21	Tr	0.71 \pm 0.20 ^a	Tr
16:1(n-9)	Tr	3.69 \pm 6.50	2.48 \pm 3.69	5.15 \pm 7.28	0.51 \pm 0.72	–	0.23 \pm 0.39
16:1(n-7)	8.14 \pm 6.45	7.80 \pm 6.14	7.63 \pm 4.42	10.91 \pm 0.88	12.64 \pm 0.42	3.53 \pm 0.15	4.09 \pm 0.83
17:1(n-7)	–	0.38 \pm 0.28	0.74 \pm 0.42	0.55 \pm 0.77	1.99 \pm 1.04 ^a	0.44 \pm 0.19	Tr
18:1(n-9)	9.74 \pm 5.94	5.27 \pm 2.30	8.40 \pm 3.45	7.07 \pm 3.86	6.40 \pm 0.05	13.62 \pm 1.23 ^a	14.31 \pm 1.90
18:1(n-7)	0.82 \pm 0.59	7.28 \pm 3.86 ^b	9.40 \pm 2.46	9.20 \pm 0.51	9.38 \pm 0.43	4.33 \pm 0.14	2.61 \pm 1.80
20:1(n-9)	0.24 \pm 0.13	0.21 \pm 0.15	Tr	–	–	0.34 \pm 0.05	0.38 \pm 0.42
24:1(n-9)	–	0.95 \pm 1.49	Tr	0.78 \pm 0.84	–	–	–
MUFA	19.42	25.56	30.17	34.06	30.91	23.13	21.62
18:2(n-6)	3.19 \pm 1.93	0.49 \pm 0.36	2.23 \pm 0.72 ^a	2.26 \pm 0.09 ^a	1.28 \pm 0.23	2.25 \pm 0.03 ^a	0.67 \pm 0.30
18:3(n-6)	Tr	–	Tr	Tr	Tr	Tr	Tr
18:3(n-3)	0.47 \pm 0.26	Tr	Tr	–	Tr	0.52 \pm 0.06 ^a	0.29 \pm 0.02 ^a
18:4(n-3)	Tr	–	–	–	Tr	0.31 \pm 0.06 ^a	–
20:2(n-6)	Tr	–	Tr	–	–	0.41 \pm 0.50	–
20:3(n-3)	–	–	–	–	Tr	–	0.50 \pm 0.37
20:5(n-3)	Tr	–	–	Tr	–	–	0.72 \pm 0.31 ^a
22:2(n-6)	0.54 \pm 0.43	0.76 \pm 0.41	0.56 \pm 0.97	2.10 \pm 2.11	–	2.01 \pm 2.89	0.54 \pm 0.57
PUFA	4.19	1.25	3.30	4.36	1.28	5.50	2.72
Σ (n-3)	0.47	Tr	Tr	Tr	Tr	0.83	1.51
Σ (n-6)	3.72	1.25	2.79	4.36	1.28	4.67	1.21
(n-3)/(n-6)	0.13	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.17	1.25
Σ Br.FA	Tr	3.39	3.10	2.65	3.21	1.36	2.87
Others	5.62	8.55	5.93	6.83	5.75	7.96	7.88

^aSignificant difference between the value of the fatty acid detected in the flagellate and the value of the corresponding fatty acid detected in bacteria (1-way ANOVA; Scheffé test $p < 0.05$);

^bSignificant difference between the value of the fatty acid detected in bacteria and the value of the corresponding fatty acid detected in MP medium (1-way ANOVA; Scheffé test $p < 0.05$)

inant saturated FAs such as 14:0, 16:0, 18:0 and branched FAs occurring in higher percentages in DFF bacteria (iso 15:0 and 16:0, anteiso 15:0 and 17:0). Values of 18:2(n-6) and 16:1(n-7) were also significantly different between the 2 bacteria cultures (Table 3; $p < 0.05$).

FA composition of heterotrophic flagellates

First, it is important to underline that bacterial contamination of flagellate GF/F filters (on a biovolume basis) was around 18.8 to 21.1% of total biovolume. The highest bacterial contamination (33%) was esti-

Table 2. Fatty acid composition (wt %) of total lipid from flagellates grown in Synura medium enriched with dry fish food (DFF). Data are weight percentages of total fatty acids and are mean \pm SD (n = 3). When SD is lacking n = 2. n: number of culture flasks (or samples in the case of DFF) analysed. Other abbreviations as in Table 1

Fatty acids	DFF	Bacteria	<i>B. saltans</i>	<i>S. pudica</i>	<i>P. vestita</i>	<i>C. paramecium</i>
10:0	–	Tr	0.50	0.65 \pm 0.52	4.07 ^a	0.90 \pm 0.25 ^a
12:0	0.54 \pm 0.17	0.22 \pm 0.10	0.53 ^a	0.82 \pm 0.33	0.33	2.79 \pm 1.13 ^a
13:0	Tr	0.42 \pm 0.25	2.64	0.91 \pm 0.61	0.20	0.84 \pm 0.39
14:0	3.70 \pm 0.66	2.42 \pm 0.37 ^b	2.98	6.09 \pm 1.50	4.47	4.59 \pm 0.64 ^a
15:0	0.42 \pm 0.06	0.59 \pm 0.07 ^b	0.83	0.80 \pm 0.30	0.82 ^a	0.98 \pm 0.13 ^a
16:0	20.96 \pm 1.32	18.25 \pm 0.29 ^b	22.67 ^a	26.93 \pm 4.94 ^a	26.7 ^a	26.36 \pm 1.74 ^a
17:0	0.39 \pm 0.07	0.62 \pm 0.28	0.73	0.98 \pm 0.60	5.91 ^a	0.83 \pm 0.09
18:0	5.34 \pm 0.83	3.14 \pm 0.84 ^b	5.55 ^a	6.45 \pm 2.24	8.57 ^a	6.78 \pm 1.15 ^a
20:0	0.85 \pm 0.24	0.75 \pm 0.40	0.73	0.25 \pm 0.32	0.52	0.87 \pm 0.17
22:0	0.50 \pm 0.17	0.63 \pm 0.34	0.53	0.30 \pm 0.14	1.05	0.46 \pm 0.13
24:0	0.39 \pm 0.23	0.39 \pm 0.29	0.50	0.49 \pm 0.70	–	0.95 \pm 1.46 ⁱ
15:0	Tr	10.24 \pm 0.67 ^b	1.01 ^a	0.52 \pm 0.37	1.17 ^a	0.52 \pm 0.16 ^a
ai15:0	–	4.37 \pm 1.23	1.02 ^a	0.49 \pm 0.10 ^a	0.55 ^a	1.04 \pm 0.52 ^a
i16:0	–	0.81 \pm 0.15	Tr	0.33 \pm 0.10 ^a	0.45	0.26 \pm 0.06 ^a
i17:0	0.41 \pm 0.30	3.57 \pm 4.26	0.27 ^a	0.62 \pm 0.21 ^a	0.44	0.27 \pm 0.02 ^a
ai17:0	–	4.62 \pm 1.22	0.30 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a	0.77 ^a	0.28 \pm 0.23 ^a
SAFA	33.50	51.03	40.79	46.95	56.03	48.72
14:1(n-5)	–	Tr	2.91 ^a	0.81 \pm 0.61	–	Tr
16:1(n-9)	–	3.11 \pm 0.96	0.71	3.43 \pm 1.94	1.11	1.35 \pm 0.37 ^a
16:1(n-7)	5.14 \pm 0.65	17.58 \pm 2.84 ^b	15.93 ^a	14.77 \pm 1.64	8.18 ^a	10.46 \pm 5.67
17:1(n-7)	0.31 \pm 0.02	1.97 \pm 0.29 ^b	1.91	0.78 \pm 0.60	Tr	0.27 \pm 0.33
18:1(n-9)	14.96 \pm 1.92	7.26 \pm 0.93 ^b	9.19	9.34 \pm 3.51	12.31 ^a	8.10 \pm 1.15
18:1(n-7)	2.27 \pm 0.27	6.72 \pm 0.84 ^b	8.90	9.57 \pm 0.73 ^a	8.69	8.72 \pm 3.72
20:1(n-9)	3.02 \pm 0.63	0.85 \pm 0.26 ^b	1.61	0.52 \pm 0.49	1.59	1.58 \pm 1.38
24:1(n-9)	–	Tr	Tr	Tr	–	0.26 \pm 0.44
MUFA	25.70	37.48	41.16	38.70	30.77	30.73
18:2(n-6)	20.70 \pm 1.37	2.86 \pm 0.23 ^b	4.88	4.25 \pm 0.17 ^a	5.12 ^a	7.37 \pm 2.62 ^a
18:3(n-6)	1.31 \pm 0.90	–	–	Tr	–	0.53 \pm 0.12 ^a
18:3(n-3)	2.27 \pm 0.18	Tr	0.44 ^a	0.37 \pm 0.07 ^a	Tr	1.67 \pm 0.87 ^a
18:4(n-3)	0.44 \pm 0.03	–	3.76	0.84 \pm 0.51	0.32	0.58 \pm 0.25
20:2(n-6)	0.80 \pm 0.55	Tr	–	–	–	–
20:4(n-6)	0.29 \pm 0.04	0.37 \pm 0.63	0.31	–	–	0.52 \pm 0.22
20:5(n-3)	1.89 \pm 0.16	Tr	0.46	0.46 \pm 0.37	Tr	2.53 \pm 1.25 ^a
22:6(n-3)	4.32 \pm 3.63	–	–	0.43 \pm 0.25	–	–
PUFA	32.02	3.23	9.86	6.35	5.44	13.20
Σ (n-3)	8.91	Tr	4.67	2.10	Tr	4.78
Σ (n-6)	23.11	3.23	5.19	4.25	1.28	8.41
(n-3)/(n-6)	0.39	<0.1	0.90	0.49	<0.1	0.57
Σ Br.FA	0.41	23.61	2.60	2.28	3.38	0.27
Others	7.80	7.38	7.19	7.41	7.12	6.75

^aSignificant difference between the value of the fatty acid detected in the flagellate and the value of the corresponding fatty acid detected in bacteria (1-way ANOVA; Scheffé test $p < 0.05$);

^bSignificant difference between the value of the fatty acid detected in bacteria and the value of the corresponding fatty acid detected in DFF medium (1-way ANOVA; Scheffé test $p < 0.05$)

mated for *Polytoma uvella*, known to be a strict osmotrophic organism (Sleigh 2000). Fortunately, the yield of total FAs extracted from filters of bacteria incubated alone was 2% of dry weight in both experimental conditions. As bacteria cell dry weight was substantially lower than that of our flagellate cells (Wood 1988), the proportion of bacterial FAs in flagellate filters was low. We calculated that, on a basis of 10% FAs (% dry weight) for flagellate cells, only 3.7 to 6.1% of the total FAs extracted originated from contaminating bacteria. This of course includes *P. uvella* filters, and

the FA amount chosen for the calculation is in good agreement with concentrations reported in protozoans by Beach et al. (1970), Erwin (1973) and Wood (1988) (5 to 15% of the dry weight, 11% in *Chilomonas* cells). The composition of the FA extracted from the flagellates cultivated in MP medium showed several inter-specific similarities (Table 1). As in bacteria, the dominant components were saturated and mono-unsaturated FAs. Saturated compounds ranged from 53.80% (of total) in *Bodo saltans* to 67.62% in *Chilomonas paramecium*. Monounsaturated FAs made

Table 3. Statistical analysis of differences in fatty acid composition of bacteria and flagellates grown on MP medium or DFF medium. The differences for each fatty acid of a same species of flagellate or of bacteria were tested between MP medium and DFF medium using a 1-way ANOVA and a Scheffé test. For the same species only the fatty acids that differ significantly are indicated ($p < 0.05$)

	Bacteria	<i>B. saltans</i>	<i>S. pudica</i>	<i>P. vestita</i>	<i>C. paramecium</i>
Bacteria	14:0, 15:0, 16:0, 18:0, 22:0 i15:0, ai15:0, i16:0, ai17:0 16:1(n-7), 18:2(n-6) 10:0, 13:0, 16:0, 18:0, 20:0				
<i>B. saltans</i>		i16:0, 20:1(n-9), 18:2(n-6), 22:2(n-6), 18:3(n-3), 18:4(n-3) 20:5(n-3)			
<i>S. pudica</i>			16:1(n-7) 18:2(n-6)		
<i>P. vestita</i>				14:0, 17:0, ai17:0 18:1(n-9), 20:1(n-9) 18:2(n-6)	
<i>C. paramecium</i>					14:0, 15:0, 16:0, 20:0, 22:0 i16:0, i17:0, 18:2(n-6) 20:5(n-3)

up from 21.62 to 34.06%, depending on the species studied. The major individual FAs belonging to these last 2 categories were on the one hand 16:0, 18:0 and 14:0, and on the other hand 16:1(n-7), 18:1(n-7), 18:1(n-9) and 16:1(n-9). All the flagellate species exhibited significant levels of FAs usually characteristic of bacteria. Thus, 1.36% (*Polytoma uvella*) to 3.21% (*Paraphysomonas vestita*) of branched FAs were detected together with quite high levels of 18:1(n-7) (Table 1). However, this last compound was more abundant in *B. saltans*, *Spumella pudica* and *P. vestita*, with approximately 9.30% of the total, than in *P. uvella* and *C. paramecium*. In each flagellate studied the amount of PUFA was low, especially in *P. vestita* and *C. paramecium* (1.28 to 2.72%) and they belonged mainly to (n-6) series with 18:2(n-6) as dominant form. Of special note was the presence of (n-3) acids with 18 carbon atoms in *P. uvella* and with 18 and 20 carbon atoms in *C. paramecium*, but the detected percentages were very low and ranged from 0.29 to 0.72% of the total FAs (Table 1).

Except for PUFA, little interspecific variation of the FA profiles was observed in flagellates grown in MP medium. This was confirmed by the principal component analysis, which showed that with the MP substrate, bacteria and flagellates are all grouped together (Fig. 2). On the other hand, intraspecific differences occurred between flagellates tested with both culture conditions (Table 3). This was particularly relevant for saturated FAs (even and branched acids) and 18:2(n-6) ($p < 0.05$). In contrast, the chrysomonads studied showed almost no significant variations (Table 3). However, all the flagellates incubated in DFF medium contained substantial amounts of PUFA, in much higher percentages than in MP medium flagellates

(Tables 1 & 2). Among these PUFA, (n-3) FAs were important contributors; for instance *Bodo saltans* contained 3.76% of 18:4(n-3) and small quantities of 18:3(n-3) and 20:5(n-3). Similarly, *Chilomonas paramecium* had 2.53% of 20:5(n-3) and 1.67% of 18:3(n-3) while the proportion of (n-3) FAs was lower in chrysomonads, especially *Paraphysomonas vestita*. Finally, it is important to note that, despite the occurrence of (n-3) compounds, 18:2(n-6) was the major PUFA in all the species analyzed (Table 2).

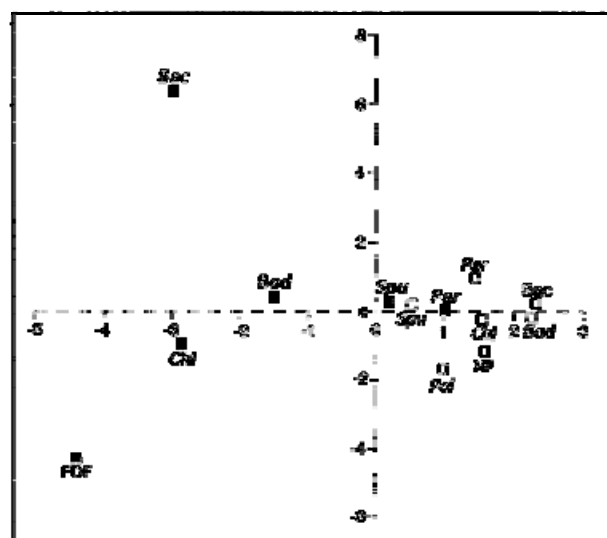


Fig. 2. Principal component plot of fatty acids extracted from flagellates, bacteria, MP and DFF. The analysis is presented for flagellates and bacteria grown on medium enriched with DFF (**bold** characters, ϕ) and medium enriched with MP (η). Bac: bacteria; Bod: *Bodo saltans*; Chi: *Chilomonas paramecium*; DFF: dry fish food; MP: milk powder; Par: *Paraphysomonas vestita*; Pol: *Polytoma uvella*; Spu: *Spumella pudica*

Concerning the other FAs constituting the profiles of the DFF flagellates, saturated FAs were dominated by 16:0, 18:0 and 14:0, while monounsaturated FAs consisted mainly of 16:1(n-7), 18:1(n-9) and 18:1(n-7). From a statistical viewpoint there were more differences between bacteria and flagellates grown in this medium than between bacteria and flagellates grown in MP medium (Table 2). Nevertheless, as observed with MP organisms, all the DFF flagellates also showed typical bacterial FAs (iso and anteiso saturated FAs and 18:1, n-7). Therefore, it is principally the PUFA composition of DFF substrate, bacteria and flagellate species that determined the statistical variations revealed by principal component analysis. This contrasts markedly with the observations made in the MP medium experiment (Fig. 2). Only DFF *Spumella pudica* and DFF *Paraphysomonas vestita* were grouped together, exhibiting great similarities with their corresponding species grown in MP medium (Fig. 2). On the other hand, bacteria, DFF substrate, DFF *Chilomonas paramecium* and DFF *Bodo saltans* were largely dispersed (Fig. 2).

DISCUSSION

The results obtained during this study underline the important effect that organic matter can have on the FA composition of heterotrophic flagellates. An enrichment substrate such as MP had a considerable influence on the FA composition of both bacteria and flagellates. But this substrate, which is poor in PUFA, did not favor the occurrence or synthesis of these compounds within flagellates. In contrast, the DFF substrate, which is rich in PUFA, seemed to lead to a considerable PUFA enrichment of the organisms, resulting in heterogeneity in their FA profiles that must have been caused by the specific PUFA metabolisms of each flagellate species.

To some extent FA compositions obtained in the flagellates in this experiment can be compared with published data, although these are few (Wood 1988). For example, authors such as Erwin et al. (1964) and Beach et al. (1970) reported that *Chilomonas paramecium* cultivated with lactate and thiamine was characterized in terms of its PUFA composition by the occurrence of small quantities of 18:3(n-3), 18:2(n-6) and 20:5(n-3). These findings agree with ours, especially in the MP medium. Similarly, there are few differences between the PUFA compositions of *Polytoma uvella* grown axenically with acetate (Erwin 1973) and those observed with MP in our experiments. In both cases, this flagellate was characterized by 18:2(n-6) and 18:3(n-6), with low proportions of 18:3(n-3).

The genus *Bodo* belongs to the kinetoplastids, a group of protozoans that are mainly parasites and that contain mostly PUFA of the (n-6) series (Wood 1988). However,

Zhukova & Kharlamenko (1999) reported the occurrence of significant percentages of 18:2(n-6), 20:2(n-6) and to a lesser extent 22:6(n-3) in a marine *Bodo* sp. grown in starch and rice cultures. Our results concerning *B. saltans* therefore showed that there was a very clear dominance of FAs of the (n-6) series and that only *B. saltans* cultivated on the DFF medium also contained FAs of the (n-3) series. In terms of the 2 chrysomonads, the published information concerns autotrophic species that usually contain high quantities of PUFA of (n-3) series and appreciable quantities of (n-6) FA (Ahlgren et al. 1992, Sargent et al. 1995). In our 2 heterotrophic species, *Paraphysomonas vestita* and *Spumella pudica*, (n-3) acids were absent from organisms cultivated on the MP medium and occurred in only small quantities in those cultivated on the DFF medium, especially in *P. vestita*. The occurrence of (n-3) and (n-6) series PUFA and of branched FAs of bacterial type in flagellates could have resulted from a slight contamination of the filters by substrate particles (PUFA) or by bacteria (in the case of iso and anteiso 15:0 and 17:0), but was more probably caused by the mode of nutrition and the PUFA biosynthesis abilities of each species of flagellate. *Bodo saltans* and species of the genera *Paraphysomonas* and *Spumella* are phagotrophic and are therefore able to ingest bacteria and particles of organic matter (Arndt et al. 2000). These particles vary in size; *B. saltans* feed mainly on bacteria, whereas *Paraphysomonas* can phagocytose microalgae the same size or larger than itself (Patterson et al. 1993, Arndt et al. 2000). Therefore, the high PUFA content of these 3 flagellates grown in DFF medium may be explained by the ingestion of substrate particles more or less decomposed by bacteria. The presence of branched chain FAs and 18:1(n-7) seems to be directly related to bacterial consumption by these 3 flagellates. Thus, uneven carbon-numbered iso and anteiso FAs and 18:1(n-7) are typical of bacteria from freshwater environments (Scribe et al. 1990, Middelburg et al. 2000). The presence of such compounds in *Chilomonas ovata* and *Polytoma uvella* is in principle more difficult to relate to a simple consumption of bacteria. These 2 flagellates are osmotrophic; their energy needs are usually satisfied by simple organic molecules and there is no evidence that they are capable of phagocytosis (Kugrens & Lee 1991, Sleight 2000). Therefore, the bacterial FAs detected in them are more probably the result of contamination of the filters, despite the fact that 18:1(n-7) was only half as abundant in these 2 flagellates as in *B. saltans*, *P. vestita* and *S. pudica*. There are, however, contradictory data that seem to prove the existence of bacterivorous activity in *Cryptomonas* sp. and other photosynthetic cryptomonads (Roberts & Laybourn-Parry 1999, Urabe et al. 2000). As the genus *Chilomonas* is closely related to *Campylomonas*, a

photosynthetic genus (Hill 1991), and as vacuoles filled with degenerating ejectisomes have been found in *Chilomonas ovata* (Kugrens & Lee 1991), it seems likely that this flagellate can ingest bacteria. But the case for *Polytoma uvella* is still uncertain. The osmotrophic life-style of *C. ovata* and *P. uvella* does, however, make them able to directly assimilate some of the PUFA released into the culture medium by bacterial hydrolysis of the substrates. The assimilation of macromolecules has already been observed in *Chilomonas* (Sleigh 2000), as has the incorporation of FAs derived from the culture medium in *Paramecium aurelia* (Kaneishiro et al. 1979).

In all cases, the flagellates in this study were characterized by a very clear dominance of FAs of the (n-6) series (mainly, 18:2,n-6). In the MP medium, only *Chilomonas paramecium* and *Polytoma uvella* contained low quantities of (n-3) PUFA. The bioconversion capacities therefore varied among species, to some extent in relation to their phylogenetic origins. For example *P. uvella* contains a degenerate plastid inherited from an ancestral autotrophic form (Gaffal & Schneider 1980) and *Chilomonas ovata* contains a leucoplast that lacks thylakoids but where starch is still formed (Kugrens & Lee 1991). In autotrophic flagellates, most of the 18:2(n-6) and 18:3(n-3) production takes place inside the plastid under the action of membrane-bound $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturases, the activity of these enzymes being very reduced in the endoplasmic reticular microsomes (Browse & Somerville 1991, Sato et al. 1997). It is therefore very probable that *C. ovata* and *P. uvella* can still produce 18:2(n-6) and 18:3(n-3) by means of $\Delta 12$ and $\Delta 15$ desaturases that are still functional with the residual plastids. In the heterotrophic tissues (e.g., seed endosperm) of higher plants the leucoplasts are also capable of synthesizing FAs (Eastmond et al. 1997). By conserving these slight bioconversion capacities, *C. ovata* and *P. uvella* reproduce, in an extremely attenuated manner, the PUFA distribution patterns normally observed in their corresponding autotrophs (Sargent et al. 1995). This explanation seems to be difficult to apply to the chrysomonads *Paraphysomonas* and *Spumella*, which contain only a very reduced leucoplast (Belcher & Swale 1976, Preisig et al. 1991) and which tend to accumulate (n-6) acids. This suggests that the $\Delta 15$ desaturase that occurs in these flagellates is defective, as McConn & Browse (1996) found that the accumulation of (n-6) FAs with negligible 18:3(n-3) is linked to defective (n-3) $\Delta 15$ desaturase in *Arabidopsis thaliana*. Among the kinetoplastids, the bodonids are probably the most primitive group (Vickerman 1991). *Bodo saltans* seems to produce almost entirely 18:2(n-6), a synthesis that in protists unrelated to plastid-containing forms can take place only through the $\Delta 12$ desaturase that occurs in

the microsomal fraction of endoplasmic reticulum (Kaneishiro et al. 1979, Avery et al. 1994).

Finally, all the flagellates studied were distinguished by their low proportions of PUFA, which may have been influenced by the temperature (20°C) and the absence of shaking in the cultures. A high culture temperature has been reported to result in a lowering of FA desaturation activity in the amoeba *Acanthamoeba castellanii* (Avery et al. 1994). Similarly, the absence of culture oxygenation in the same amoeba was reflected by a low PUFA content, whereas oxygenation of the cultures led to a 10-fold increase in $\Delta 12$ desaturase enzyme activity (Avery et al. 1996). However, as long as they are not placed in low-temperature conditions, the low cell PUFA content does not alter the growth of unicellular organisms (Peyou-Ndi et al. 2000).

In conclusion, we found that different heterotrophic flagellates have different PUFA synthesis and bioconversion capacities. These capacities also seem to be limited depending on the physicochemical conditions and are especially effective in the case of (n-6) series PUFA. Furthermore, the quality of the culture enrichment substrates and their PUFA contents have a very strong influence on those of the flagellates. As a result, in the natural environment, the PUFA content of heterotrophic flagellates seems to us to depend mainly on that of the picoplanktonic prey or organic matter that is ingested. Accordingly, the relative intakes by phagotrophy and osmotrophy should play a major role that is worthy of further study, since under the culture conditions used in the present study, heterotrophic flagellates seemed to be too poor in (n-3) series PUFA to be able to sustain major zooplankton growth by themselves.

LITERATURE CITED

- Ahlgren G, Gustafsson I, Boberg M (1992) Fatty acid and chemical composition of freshwater microalgae. *J Phycol* 28:37–50
- Arndt H, Dietrich D, Auer B, Cleven EJ, Gräfenham T, Weitere M, Mylnikov AJ (2000) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis Ltd, London, p 240–269
- Arts MT (1998) Lipids in freshwater zooplankton: selected ecological and physiological aspects. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer-Verlag, New York, p 71–86
- Avery SV, Lloyd D, Harwood J (1994) Changes in membrane fatty acid composition and $\Delta 12$ -desaturase activity during growth of *Acanthamoeba castellanii* in batch culture. *J Eukaryot Microbiol* 41:396–401
- Avery SV, Harwood J, Rutter AJ, Lloyd D (1996) Oxygen dependent low-temperature composition and $\Delta 12$ (n-6)-desaturase induction and alteration of fatty acid composition in *Acanthamoeba castellanii* in batch culture. *Microbiology* 142:2213–2221
- Barclay WR, Meager KM, Abril JR (1994) Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae

- and algae-like organisms. *J Appl Phycol* 6:123–129
- Beach DH, Harrington GW, Holz GG (1970) The polyunsaturated fatty acids of marine and freshwater cryptomonads. *J Protozool* 17:501–510
- Belcher JH, Swale EMF (1976) *Spumella elongata* (Stokes) nov. comb., a colourless flagellate from soil. *Arch Protistenkd* 118:215–220
- Browse J, Somerville C (1991) Glycerolipids synthesis: biochemistry and regulation. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 42:467–506
- Burns CW, Schallenberg M (1996) Relative impacts of copepods, cladocerans and nutrients on the microbial food web of a mesotrophic lake. *J Plankton Res* 15:683–714
- Cavalier Smith T (2000) Flagellate megaevolution: the basis for eukaryote diversification. In: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis Ltd, London, p 361–391
- Desvillettes C, Bourdier G, Amblard C, Barth B (1997) Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshw Biol* 38: 629–637
- Eastmond PJ, Dennis DT, Rawsthorne S (1997) Evidence that a malate/inorganic phosphate exchange translocator import carbon across the leucoplast envelope of a fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm. *Plant Physiol* 114:851–856
- Erwin JA (1973) Lipids and biomembranes of eukaryotic microorganisms. In: Erwin JA (ed) *Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms*. Academic Press, New York, p 41–143
- Erwin JA, Hulanicka D, Bloch K (1964) Comparative aspect of unsaturated fatty acids synthesis. *Comp Biochem Physiol* 12:191–207
- Folch JM, Less M, Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226:497–509
- Gaffal KP, Schneider GJ (1980) Morphogenesis of the plastidome and flagellar apparatus during the vegetative life cycle of the colorless phytoflagellate *Polytoma papillatum*. *Cytobios* 105:43–61
- Gifford DJ (1991) The protozoan-metazoan trophic link in pelagic ecosystems. *J Protozool* 38:81–86
- Goldman JC, Dennet MR (1990) Dynamics of prey selection by an omnivorous flagellate. *Mar Ecol Prog Ser* 59:183–194
- Harrington GW, Holz GG (1968) The monoenoic and docosa-hexaenoic fatty acids of a heterotrophic dinoflagellate. *Biochim Biophys Acta* 164:137–139
- Harrington GW, Beach DH, Dunham JE, Holz GG (1970) The polyunsaturated fatty acids of marine dinoflagellate. *J Protozool* 17:213–219
- Hill DRA (1991) Diversity of heterotrophic cryptomonads. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The systematics association. Clarendon Press, Oxford, p 235–241
- Kaneishiro ES, Beischel LS, Merkel SJ, Rhoads DL (1979) The fatty acid composition of *Paramecium aurelia* cells and cilia: changes with culture age. *J Protozool* 26:147–158
- Klein Breteler WCM, Schogt N, Baas M, Schouten S, Kraay GW (1999) Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Mar Biol* 135:191–198
- Kugrens P, Lee RE (1991) Organization of cryptomonads. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The systematics association. Clarendon Press, Oxford, p 219–235
- Laybourn Parry J, Parry J (2000) Flagellates and the microbial loop. In: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis Ltd, London, p 216–240
- McConn M, Browse J (1996) The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* 8:403–416
- Middelburg JJ, Barranguet C, Boschker HTS, Herman PMJ, Moens T, Heip CHR (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: an in situ ¹³C-labeling study. *Limnol Oceanogr* 45:1224–1234
- Patterson DJ, Nygaard K, Steinberg G, Turley CM (1993) Heterotrophic flagellates and other protists associated with oceanic detritus throughout the water column in the mid North Atlantic. *J Mar Biol Assoc UK* 73:67–95
- Peyou-Ndi MM, Watts JL, Browse J (2000) Identification and characterization of an animal $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 15:399–408
- Preisig HR, Vors N, Hållfors G (1991) Diversity of heterotrophic heterokont flagellates. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The systematics association. Clarendon Press, Oxford, p 361–401
- Provasoli L, Pintner IS (1960) Artificial media for freshwater algae. In: Tryon CA, Hatmann RT (eds) *The ecology of algae*. Pymatuning Symposia, p 84–86
- Roberts E, Laybourn-Parry J (1999) Mixotrophic chrysophytes and their predators in the Dry Valley Lakes of Antarctica. *Freshw Biol* 41:737–746
- Sanders RW, Whickham SA (1993) Planktonic protozoa and metazoa predation, food quality and population control. *Mar Microb Food Webs* 7:197–223
- Sargent JR, Bell MV, Henderson RJ (1995) Protists as source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for vertebrate development. In: Brugerolle G, Mignot JP (eds) *Protistological actualities*. Proc 2nd Eur Cong Protistol. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, p 54–64
- Sato N, Fujiwara S, Kawaguchi A, Tsuzuki M (1997) Cloning a gene for chloroplast $\omega 6$ desaturase of a green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biochem* 122:1224–1232
- Scribe P, Ngoumbi-Nzouzi JS, Fuché C, Pèpe C, Salot A (1990) Biogeochemistry of organic matter in lake Geneva. I. Particulate hydrocarbons as biogenic and antropogenic molecular markers. *Hydrobiologia* 207:319–331
- Sleigh MA (2000) Trophic strategies. In: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis Ltd, London, p 147–166
- Stoecker DK, McDowell Capuzzo J (1990) Predation on protozoa: its importance to zooplankton. *J Plankton Res* 12: 891–908
- Urabe J, Bahadur Gurung T, Yoshida T, Sekino T, Nakanishi M (2000) Diel changes in phagotrophy by *Cryptomonas* in lake Biwa. *Limnol Oceanogr* 45:1558–1563
- Vickerman L (1991) Organization of the Bodonid flagellates. In: Patterson DJ, Larsen J (eds) *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. The systematics association. Clarendon Press, Oxford, p 159–176
- Wood BJB (1988) Lipids of algae and protozoa. In: Ratledge C, Wilkinson SG (eds) *Microbial lipids*. Academic Press, London, p 806–867
- Zhukova NV, Aizdaicher NA (1995) Fatty acid composition of 15 species of marine microalgae. *Phytochemistry* 39:351–356
- Zhukova NV, Kharlamenko VI (1999) Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. *Aquat Microb Ecol* 17:153–157
- Zubkov MV, Sleigh MA (1995) Bacterivory by starved marine heterotrophic nanoflagellates of two species that feed differently, estimated uptake of dual radioactive-labelled bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* 17:57–66

NOTE

**Nutritional quality of a freshwater heterotrophic flagellate:
trophic upgrading of its microalgal diet for *Daphnia hyalina*****Alexandre Bec^{1,2,*}, Christian Desvillettes¹, Aurélie Véra¹, Charles Lemarchand¹,
Dominique Fontvieille², Gilles Bourdier¹**¹Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France²CARTELL, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac cedex, France

ABSTRACT: Bacterivorous freshwater heterotrophic flagellates seem to be too poor in (n-3) series polyunsaturated fatty acids (PUFA) to be able to sustain major zooplankton growth by themselves. This study shows that when the heterotrophic flagellate *Aulacomonas submarina* fed on microalgae, either *Rhodomonas lacustris* (*Aulacomonas/R.*) or *Chlorogonium elongatum* (*Aulacomonas/C.*), this species exhibited (n-3) series PUFA in great quantities. Therefore, *A. submarina* PUFA composition seems to depend mainly on its algal diet. However, the biosynthetic capacities of *A. submarina* seem to have endowed it with greater amounts of 20 PUFA and a more diversified PUFA composition. Moreover, this study also shows that *Daphnia hyalina* exhibits a higher fecundity when fed on *Aulacomonas/C.* (or *Aulacomonas/R.*) than is the case when fed on *C. elongatum* (or respectively *R. lacustris*). This suggests that the ability of *A. submarina* to convert dietary lipids results in the biochemical value of its food source being upgraded.

KEY WORDS: Heterotrophic nanoflagellates · Nutritional quality · Fatty acids · PUFA

Resale or republication not permitted
without written consent of the publisher

Numerous studies devoted to the functioning of the microbial loop in marine or lacustrine environments have shown the key role of protozoans in transferring organic matter from small size particules to higher trophic levels (Sherr & Sherr 1988, Gifford 1991). Among these protozoans, heterotrophic nanoflagellates (HNF) exhibit sizes and at times relatively great abundance, which render them important prey for zooplanktonic microcrustacea (Sanders & Wickham 1993, Laybourn Parry 2000). Nonetheless, it has been shown that although zooplankton predation rates on HNF are often high, this does not assure that HNF can be a high quality food (Sanders et al. 1996). Indeed, morphology and movement influence the grazing efficiency of zooplankton whereas the biochemical composition of the

food determines its nutritive value (Ahlgren et al. 1990, Mayzaud et al. 1998).

In natural environments, sestonic phosphorus (Elser et al. 2001, Makino et al. 2002) and specific lipid compounds (Arts 1998, Müller-Navarra et al. 2000) can be dependable predictors of food quality for zooplankton. In the same way, ciliates and HNF have a high incorporation of P (Caron & Goldman 1990) and thus may be a particularly important source of phosphorus-containing compounds for zooplankton. Nevertheless, mineral content alone is insufficient to predict food quality (Anderson & Hessen 1995, Müller-Navarra 1995) and it has been suggested that essential food compounds, especially (n-3) series polyunsaturated fatty acids (PUFA), play a significant role (Wacker & Von Elert 2001).

Compared with microalgae, lipid and fatty acid composition of freshwater HNF have attracted less attention (Desvillettes et al. 1997). However, recent work by Véra et al. (2001) showed that typical aquatic HNF, such as *Spumella* and *Paraphysomonas*, have little capacity for synthesizing (n-3) series PUFA and exhibit fatty acid profiles strongly influenced by their food. Furthermore, when fed on bacteria, these HNF species lack (n-3) PUFA as bacteria generally do not produce PUFA (Napolitano 1998). Thus, it is possible that freshwater algivorous flagellates exhibit (n-3) series PUFA in much greater quantities than the bacterivorous ones do. Indeed, in marine environments, it has been suggested that algivorous protozoans contain (n-3) series PUFA in great amounts (Claustre et al. 1989). Moreover, Klein Brettel et al. (1999) suggested that, as protozoans may produce new compounds, they upgrade the biochemical composition of food rather than merely repackage it. In this context, we therefore initially compared the PUFA compositions of the

algivorous flagellate *Aulacomonas submarina* to PUFA compositions of 2 types of algal food, the Cryptophyceae *Rhodomonas lacustris* and the Chlorophyceae *Chlorogonium elongatum*. We then investigated whether the addition of *A. submarina* as a trophic intermediate in the simplified nanoplanktonic microalga-zooplankton food chain affected cladoceran development and reproduction. With a view to this, we conducted growth experiments on *Daphnia hyalina* fed 4 different diets: (1) *A. submarina* fed on *R. lacustris*; (2) *A. submarina* fed on *C. elongatum*; (3) *R. lacustris*; or (4) *C. elongatum* in order to compare their nutritional value for the cladoceran.

Material and methods. Protists cultures: The different protists were obtained from our own laboratory collection. The autotrophic flagellates, *Rhodomonas lacustris* (12 µm long) and *Chlorogonium elongatum* (18 µm long) were mass cultivated in a modified Synura medium (Vé ra et al. 2001). These cultures were grown semi-continuously at 20°C under a 12:12 h light:dark photoperiod. In order to maintain an exponential growth rate, 20 to 40% of the medium was renewed every other day. The algivorous flagellate *Aulacomonas submarina* (10 to 30 µm long) was grown in 800 ml of Synura medium to which 100 ml of *R. lacustris* culture or *C. elongatum* culture was added daily. Each culture was conducted in triplicate.

Zooplankton culture: *Daphnia hyalina* was isolated from zooplankton samples collected in Lake Annecy,

France, and cultured in spring water, and fed every other day with a 50/50 mixture of freeze-dried fish foods (Tetramin® + Tetraphyll®) broken down into fine particles by ultrasound.

Growth experiment: Twelve 600 ml glass tanks were filled with spring water. Each tank received 50 newly hatched *Daphnia hyalina* (<12 h old). For 10 d, triplicates of 50 *D. hyalina* each were fed daily with *Rhodomonas lacustris* cells, *Aulacomonas submarina* cells grown on *R. lacustris* (*Aulacomonas/R.*), *Chlorogonium elongatum* cells and *A. submarina* cells grown on *C. elongatum* (*Aulacomonas/C.*). This experiment was conducted at 20°C under a 12:12 h light:dark cycle and food concentration was 1.5×10^4 cells ml⁻¹. Thus, the cladocerans in each treatment were not limited by food quantity. At the end of the survey, *D. hyalina* survival, *D. hyalina* length and egg number per female were recorded.

Statistical analysis: The survival rate, the length and the fecundity of the cladocerans at the end of each experiment were compared 2-by-2 with a 1-way ANOVA (Scheffé test) ($p < 0.01$).

Sampling and fatty acid analysis: Microalgae and *Aulacomonas submarina* were recovered by filtration on precombusted GF/F glass-fiber filters. Before filtration or *Daphnia hyalina* feeding, *A. submarina* cells in culture were starved for 36 h in the dark. This treatment reduced the size of the cell to around 10 to 15 µm in length, caused the digestion vacuoles to disappear (see Fig. 1) and allowed us to check that no residual *Rhodomonas lacustris* or *Chlorogonium elongatum* were present in the culture. Fatty acid analyses were performed on samples (3 aliquots of different flasks) of food algae and *A. submarina*. After extraction and derivatization, fatty acids were identified by gas chromatography. A full description of the methodology used was given previously by Vé ra et al. (2001).

Results and discussion. Changes in PUFA composition of *Aulacomonas submarina* in response to diets (Figs. 2 & 3): *Rhodomonas lacustris*, like other autotrophic cryptomonads, was characterized by high percentages of 18:4(n-3) and 20:5(n-3), whereas *Chlorogonium elongatum* exhibited a different PUFA composition dominated by 16:4(n-3) and 18:3(n-3), both typical of Chlorophyceae PUFA (Sargent et al. 1995). As shown in Figs. 2 & 3, these microalgae had a marked influence on the PUFA composition of *A. submarina*. The PUFA content of starved *A. submarina* was strongly dominated by the (n-3) series, which is not the case for bacterivorous HNF, for which (n-6) fatty acid series constitute the main PUFAs (Desvillettes et al. 1997, Vé ra et al. 2001). As shown in Figs. 2 & 3, the PUFA composition of *Aulacomonas/C.* differs from that of *Aulacomonas/R.* as *Aulacomonas/C.* had fewer 20 (n-3) series PUFA characteristic of cryptomonads

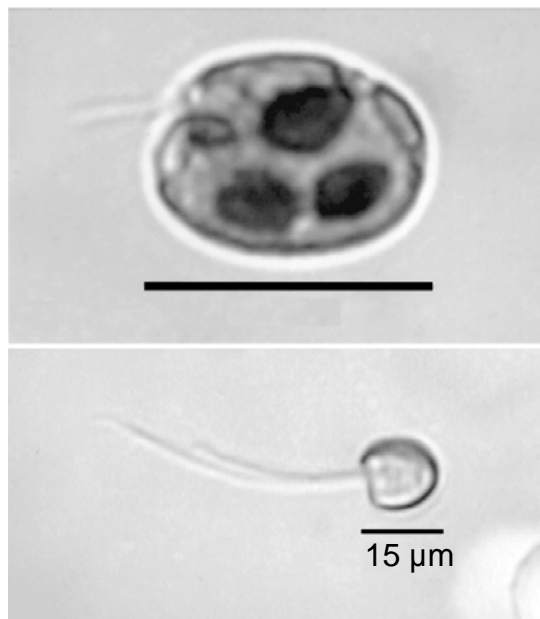


Fig. 1. (a) Live cell of *Aulacomonas submarina* fed on *Rhodomonas lacustris* before starvation. (b) Live cell of *A. submarina* after starvation. Note that the cell biovolume is reduced and that digestion vacuoles have disappeared

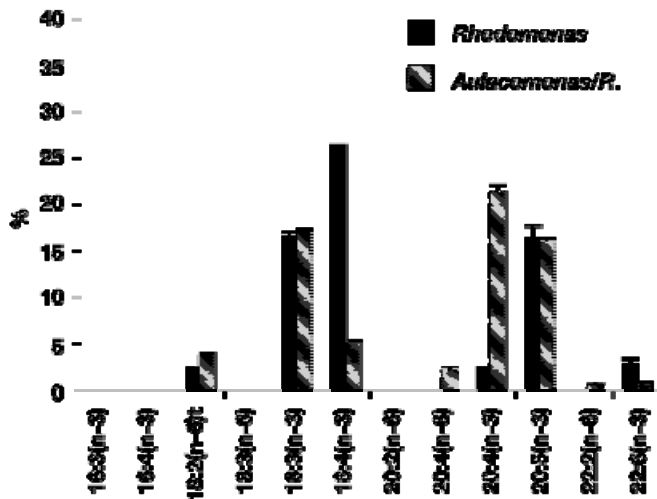


Fig. 2. Polyunsaturated fatty acid compositions (wt % of total fatty acids) of *Rhodomonas lacustris* and *Aulacomonas submarina* fed on *R. lacustris* (Aulacomonas/R.).

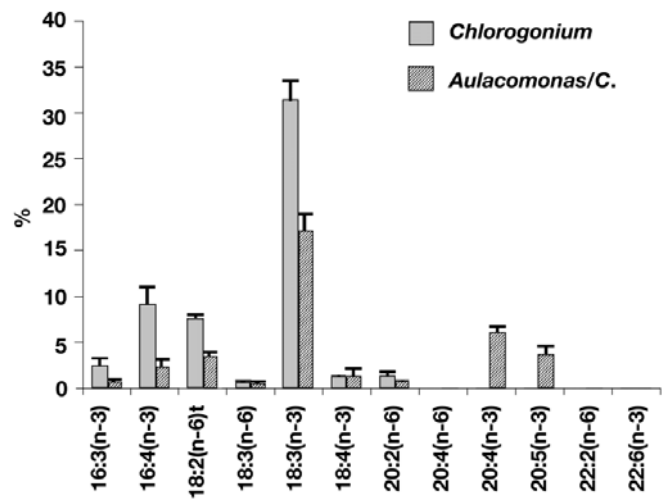


Fig. 3. Polyunsaturated fatty acid compositions (wt % of total fatty acids) of *Chlorogonium elongatum* and *Aulacomonas submarina* fed on *C. elongatum* (Aulacomonas/C.).

and more 16 (n-3) series PUFA characteristic of Chlorophyceae. Likewise, Klein Breteler et al. (1999) showed that the heterotrophic dinoflagellate *Oxyrrhis marina* fed on the Chlorophyceae *Dunaliella* sp. (*Oxyrrhis/D.*) also contained 16 (n-3) series PUFA. However, it should be noted that *A. submarina* lipid analyses were performed after a period of starvation, which caused the digestion vacuoles to disappear. This allowed us to hypothesize that these typical algal PUFA had become part of *A. submarina* lipids.

Comparison of the PUFA composition of *Aulacomonas submarina* and its food sources seems to suggest that it is able to bioconvert fatty acid. Indeed, *Aulacomonas/R.*, in contrast to *Rhodomonas lacustris*, contains inverse proportions of 20:4(n-3) and 18:4(n-3), and *Aulacomonas/C.*, in contrast to *Chlorogonium elongatum*, has 20:4(n-3) and 20:5(n-3) in significant quantities. Similarly, Klein Breteler et al. (1999)

reported that, unlike *Dunaliella* sp., *Oxyrrhis/D.* exhibited long chain PUFA like 22:6(n-3). *A. submarina*, therefore, seems to convert PUFA from its food into long carbon chain PUFA through a process of elongation and desaturation. In *Aulacomonas/R.*, dietary 18:4(n-3) was probably elongated into 20:4(n-3) and in *Aulacomonas/C.*, dietary 18:3(n-3) seemed to be partially bioconverted into 20:4(n-3) and finally into 20:5(n-3) by means of $\Delta 6$ and $\Delta 5$ desaturases. As this algivorous flagellate is a protista incertae sedis distantly related to heterokont flagellates (Brugerolle & Patterson 1990) and does not contain any residual plast, unlike a number of freshwater genera (*Spumella*, *Paraphysomonas*, *Polytoma*; Arndt et al. 2000), these desaturases are probably located in endoplasmic reticulum, as observed for ciliates.

Finally, even if dietary PUFA have a marked influence on *Aulacomonas submarina* lipid composition,

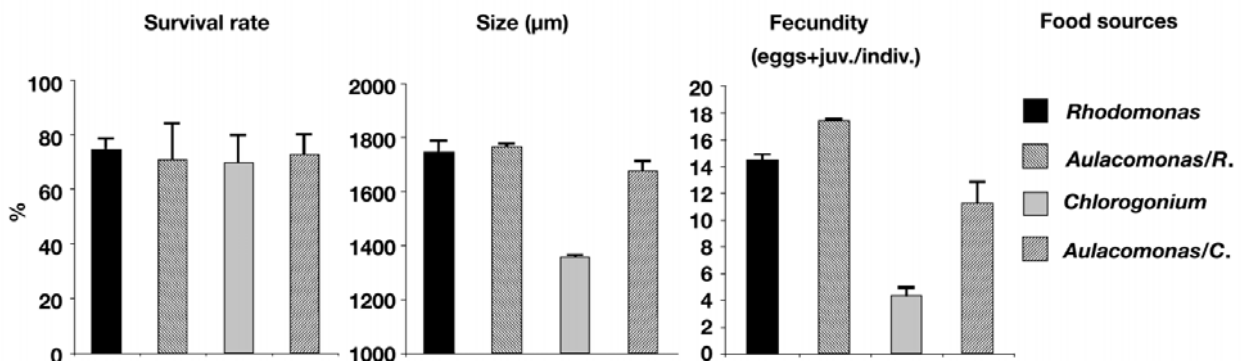


Fig. 4. Survival rate, size and fecundity of *Daphnia hyalina* fed on *Rhodomonas lacustris*, *Aulacomonas/R.*, *Chlorogonium elongatum* and *Aulacomonas/C.*

this PUFA bioconversion results in *Aulacomonas/R.* and *Aulacomonas/C.* having high amounts of both 20:4(n-3) and 20:5(n-3). It is worth noting that the ratios of the percentages of 18:4(n-3):20:4(n-3) and 18:4(n-3):20:5(n-3) calculated for *Aulacomonas/R.* (i.e. 0.22 and 0.30 respectively) are equivalent to those calculated in *Aulacomonas/C.* (i.e. 0.21 and 0.35 respectively). Thus, this PUFA bioconversion seems to play an important role (changes in cellular membrane conformation?) which needs further investigation.

Nutritional quality of *Aulacomonas submarina* and the different food sources: The different food sources all allowed the development and reproduction of *Daphnia hyalina* (Fig. 4). The survival rates measured for the 4 treatments were not significantly different ($p < 0.01$). However, the size and fecundity of the cladocerans fed on *Chlorogonium elongatum* were distinctly low. It is also interesting to note that the presence of neonates or juveniles were not recorded in the *C. elongatum* treatment, which shows that cladocerans fed on *C. elongatum* develop more slowly. Moreover, the fecundity recorded in the *Aulacomonas/R.* treatment was significantly the highest ($p < 0.01$). Thus, these results show that *A. submarina* is of better nutritional quality for *D. hyalina* than the microalga it feeds on. Similarly, recent studies have also suggested that protozoans may improve the food quality for marine copepods by acting as intermediate prey (Klein Breteler et al. 1999, Tang et al. 2001).

In view of the similar morphological characteristics (size, mobility) of the microalgae and the heterotrophic flagellate tested, their biochemical composition may be the main factor influencing their food quality. Thus, the low nutritional value of *Chlorogonium elongatum*, like that of Chlorophyceae in general, seems to be most often connected with a lack of 20:5(n-3) (Ahlgren et al. 1990, Brett & Müller-Navarra 1997). In contrast, *Aulacomonas/C.* could have supplied the cladocerans with important quantities of 20 PUFA notably of 20:5(n-3). The elongation and desaturation capacities of the heterotrophic flagellate therefore seem to explain why *Aulacomonas/C.* is of better nutritional value than *C. elongatum* alone. The addition of *A. submarina* as an intermediate in the *Rhodomonas lacustris*-*Daphnia hyalina* simplified trophic chain had less influence on the development of the cladocerans than had been previously assumed (Fig. 4). Nevertheless it should be recalled that Cryptophyceae are recognised as already being of high nutritional value due to their high 20:5(n-3) contents (Ahlgren et al. 1990). However, *Aulacomonas/R.* could provide more diversified specific compounds than *R. lacustris* alone, notably specific sterols (Klein Breteler et al. 1999). These latter compounds must be taken into account for determining the quality of zooplankton food (Von Elert & Wolffrom 2001).

Conclusion. Generally speaking, the essential compound contents of protozoans (here fatty acids) depend on the synthetic capacities peculiar to each species but above all on the biochemical composition of the food available. The considerable variations in the biochemical composition of heterotrophic flagellates which may ensue largely explain the extreme variability of their own nutritional value, as observed by Sanders & Wickham (1993). Strictly from the point of view of (n-3) series PUFA contents, free HNF fed on bacteria do not seem to constitute a high quality food (Véra et al. 2001); it seems on the other hand that flagellates able to ingest microalgae are of much better quality. This study shows that an algivorous flagellate, such as *Aulacomonas submarina*, accumulates and also modifies the dietary PUFA and by doing so can upgrade the nutritional value of its algal food source.

Finally, as heterotrophic flagellates are generally considered as the major consumers of autotrophic picoplanktonic species (Weisse 1993, Dolan & Imek 1998) mainly composed of picocyanobacteria and picochlorophyceae poor in 20 PUFA, trophic upgrading of autotrophic picoplankton food quality by heterotrophic flagellates can become an important source of essential compounds for zooplankton. This may prove to be a key process in the functioning of aquatic ecosystems whose importance remains to be specified.

LITERATURE CITED

- Ahlgren G, Lundstedt L, Brett M, Forsberg C (1990) Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. *J Plankton Res* 12: 809–818
- Anderson TR, Hessen DO (1995) Carbon or nitrogen limitation in marine copepods? *J Plankton Res* 17:317–331
- Arndt H, Dietrich D, Auer B, Cleven EJ, Gräfenham T, Weitere M, Mylnikov AJ (2000) Functional diversity of heterotrophic flagellates in aquatic ecosystems. In: Leadbeater BSC, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis, London, p 240–269
- Arts MT (1998) Lipids in freshwater zooplankton selected ecological and physiological aspects. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer-Verlag, New York, p 71–86
- Brett MT, Müller-Navarra DC (1997) The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. *Freshw Biol* 38:483–500
- Brugerolle G, Patterson DJ (1990) A cytological study of *Aulacomonas submarina* Skuja 1939, a heterotrophic flagellate with a novel ultrastructural identity. *Eur J Protistol* 25: 191–199
- Caron DA, Goldman JC (1990) Protozoan nutrient regeneration. In: Capriulo GM (ed) *Ecology of marine protozoa*. Oxford University Press, New York, p 283–306
- Claustre H, Marty JC, Cassiani L, Dagaut J (1989) Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian sea: ecological implications. *Mar Microb Food Webs* 3:51–66
- Desvillettes C, Bourdier G, Amblard C, Barth B (1997) Use of

- fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. *Freshw Biol* 38: 629–637
- Dolan JR, Limek K (1998) Ingestion and digestion of an autotrophic picoplankter, *Synechococcus*, by a heterotrophic nanoflagellate, *Bodo saltans*. *Limnol Oceanogr* 43: 1740–1746
- Elser JJ, Hayakawa K, Urabe J (2001) Nutrient limitation reduces food quality for zooplankton: *Daphnia* response to seston phosphorus enrichment. *Ecology* 82:898–903
- Gifford DJ (1991) The protozoan-metazoan trophic link in pelagic ecosystems. *J Protozool* 38:81–86
- Harvey HR, Ederington MC, McManus GB (1997) Lipid composition of the marine ciliates *Pleuronema* sp. and *Fabrea salina*: shifts in response to change diets. *J Eukaryot Microbiol* 44:189–193
- Klein Breteler WCM, Schogt N, Baas M, Schouten S, Kraay GW (1999) Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. *Mar Biol* 135:191–198
- Laybourn Parry J (2000) Flagellates and the microbial loop. In: Leadbeater BSG, Green JC (eds) *The flagellates, unity diversity and evolution*. Taylor & Francis, London, p 216–240
- Makino W, Urabe J, Elser JJ, Yoshimizu C (2002) Evidence of phosphorus-limited individual and population growth of *Daphnia* in a Canadian Shield lake. *Oikos* 97:197–205
- Mayzaud P, Tirelli V, Bernard JM, Roche-Mayzaud O (1998) The influence of food quality on the nutritional acclimation of the copepod *Acartia clausi*. *J Mar Syst* 15: 483–493
- Müller-Navarra DC (1995) Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. *Arch Hydrobiol* 132:297–307
- Müller-Navarra DC, Brett MT, Liston AM, Goldman CR (2000) A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. *Nature* 403:74–77
- Napolitano GE (1998) Fatty acids as trophic and chemical markers. In: Arts MT, Wainman BC (eds) *Lipids in freshwater ecosystems*. Springer-Verlag, New York, p 21–44
- Sanders RW, Wickham SA (1993) Planktonic protozoa and metazoa: predation, food quality and population control. *Mar Microb Food Webs* 7:197–223
- Sanders RW, Williamson CE, Stutsman PL, Moeller RE, Goulden CE, Aoki-Goldsmith R (1996) Reproductive success of 'herbivorous' zooplankton fed algal and non algal food resources. *Limnol Oceanogr* 41:1295–1305
- Sargent JR, Bell MV, Henderson RJ (1995) Protists as source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for vertebrate development. In: Brugerolle G, Mignot JP (eds) *Protistological actualities*. Proc 2nd Eur Congr Protistol. Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, p 54–64
- Sherr EB, Sherr BF (1988) Role of microbes in pelagic food webs: a revised concept. *Limnol Oceanogr* 33:1225–1227
- Tang KW, Jakobsen HH, Visser AW (2001) *Phaeocystis globosa* (Prymnesiophyceae) and the planktonic food web: feeding, growth, and trophic interactions among grazers. *Limnol Oceanogr* 46:1860–1870
- Vé ra A, Desvillettes C, Bec A, Bourdier G (2001) Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates: an experimental study. *Aquat Microb Ecol* 25:271–279
- Von Elert E, Wolffrom T (2001) Supplementation of cyanobacterial food with polyunsaturated fatty acids does not improve growth of *Daphnia*. *Limnol Oceanogr* 46: 1552–1558
- Wacker A, Von Elert E (2001) Polyunsaturated fatty acids: evidence for non-substitutable biochemical resources in *Daphnia galeata*. *Ecology* 82:2507–2520
- Weisse T (1993) Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Adv Microb Ecol* 13: 327–369

Editorial responsibility: John Dolan,
Villefranche-sur-Mer, France

Submitted: October 4, 2002; Accepted: January 23, 2003
Proofs received from author(s): April 28, 2003

Nutritional value of different food sources for the benthic Daphnidae *Simocephalus vetulus*: role of fatty acids

Alexandre Bec^{1,2*}, Christian Desvillettes¹, Aurelie Véra¹,
Dominique Fontvieille² and Gilles Bourdier¹

With 2 figures and 6 tables

Abstract: In this experimental study, growth, survival and fecundity of the benthic Cladoceran *Simocephalus vetulus* were measured when feeding on *Cryptomonas ovata*, *Paraphysomonas vestita*, *Cyclidium glaucoma* and particulate amorphous organic matter to investigate the nutritional value of these food sources. Cladocerans fed *Cr. ovata* (autotrophic flagellate) exhibited the highest fecundity and growth. Particulate organic matter (POM, mainly composed of detrital particles) and *Cy. glaucoma* (ciliate) supported a lower grow and neonate production. *P. vestita* (heterotrophic flagellate) was inadequate to promote development and fecundity of *S. vetulus* and also resulted in high mortality. The concentrations of (n-3) series polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the tested diets seemed to be the main factor determining their nutritional quality. *S. vetulus*' fecundity and increase in size were significantly correlated with the percentages of (n-3) PUFA in the diet, especially eicosapentaenoic acid (20:5 n-3). Although PUFA concentrations in *Cy. glaucoma* and POM were substantially lower than those provided by *Cr. ovata*, an apparent ability to bioconvert PUFA allowed *S. vetulus* to reproduce successfully. The fatty acid profiles of neutral lipids and phospholipids of the cladocerans indicate that *S. vetulus* is able to synthesise long-chain PUFA from dietary C18 PUFA through a process of elongation and desaturation. However, the long chain (n-3) PUFA, especially 20:5(n-3), in the lipids of *P. vestita* were apparently too scarce to be compensated for by bioconversion.

Key words: PUFA, diet, food quality, fatty acid composition, Cladocera.

¹ **Authors' addresses:** Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR CNRS 6023, Université Blaise Pascal, 63177 Aubière cedex, France.
E-mail: Alexandre.BEC@univ-bpclermont.fr

² C.A.R.R.T.E.L, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac cedex, France.

* Corresponding author.

Introduction

Simocephalus vetulus is a common cladoceran inhabiting macrophyte-rich littoral zones of freshwaters (Amoros & Chessel 1985, Frey 1987). Belonging to the Daphnidae, a family dominated by planktonic species, this microcrustacean shows a benthic behaviour and can be an important component of lotic system zooplankton, although it is not well adapted to stream life (Amoros 1984). Little is known about its feeding and food requirements (Desvillettes et al. 1994), but like most benthic Cladocera inhabiting lake littoral zones and river backwaters, *S. vetulus* is thought to feed on microalgae and protozoa, biofilm and fine suspended detrital particles (Dole-Olivier et al. 2000). In this type of habitat, the shallow water and the high concentrations of allochthonous organic matter favour a high primary and bacterial production which, theoretically do not quantitatively limit crustacean production (Sand-Jensen et al. 1989). Therefore, food quality may be more important than food quantity for survival, growth and reproduction in many benthic invertebrates including Cladocera (Norsher & Støttrup 1994, Goedkoop et al. 1998). Evidence for the importance of food quality also comes from zooplankton studies, which have focused almost exclusively on seston nutritional quality for lacustrine Cladocera. Nutritional quality is firstly determined by the morphology of microalgae which influence their ingestibility and digestibility (DeMott 1986, Van Donk et al. 1997). Secondly, the development of Daphnidae in lakes may be linked to the C : P ratios of seston (Urabe et al. 1997). According to these authors, the mineral composition of sestonic microalgae can constitute an important aspect of their nutritional quality: for instance extremely low phosphorus content in seston particles leads to poor growth of Cladocera. Lastly, the biochemical composition of food, such as the amount of certain amino acids and certain fatty acids can be determining factors for nutritional quality (Klein Breteler et al. 1999). More particularly, long chain polyunsaturated fatty acids of the linolenic (n-3) family have excited much interest because of their major physiological roles (Stanley-Samuelson 1994 a, b, Brett & Müller-Navarra 1997). For example, eicosapentaenoic acid (20 : 5 n-3) and docosahexaenoic acid (22 : 6 n-3) are essential for many aquatic animals, and a number of studies have indicated the importance of 20 : 5(n-3) for planktonic Daphnidae development (Müller-Navarra 1995, Brett & Müller-Navarra 1997, DeMott & Müller-Navarra 1997).

This approach to seston nutritional quality based on long chain PUFA content is complicated when performed with lotic Cladocera, owing to the fact that particulate organic matter in backwaters has a complex composition and may be more dominated by detritus than is lake seston. As stated above, not only phototrophic protists but also bacteria, detrital particles and protozoa may be potentially important food sources (Desvillettes et al. 1994, 1997). Ciliates

and heterotrophic flagellates are known to be subjected to a heavy predation pressure by many zooplankton species including Cladocera, but whether they are a source of PUFA for zooplankton is not well established (Sargent et al. 1995).

Therefore, the principal aim of this study was to evaluate the nutritional quality of different food sources for *S. vetulus*. The investigation presented here is part of an extensive study on backwaters of the river Allier (France) and, therefore, a variety of food sources were used, representing the available food for *S. vetulus* in this river system.

We used *Cryptomonas ovata*, an autotrophic flagellate, because cryptomonads are observed in spring within macrophyte beds of the river Allier. Two protozoa representatives of freshwater communities were chosen, *Paraphysomonas vestita*, an obligate heterotrophic flagellate, and *Cyclidium glaucoma*, a scuticociliate. Both were observed in Allier backwaters. Lastly, a complex assemblage of detrital particles was collected within macrophytes and used as test diet. This study compares the growth of *S. vetulus* on potential food resources that differ in their fatty acid compositions. It also includes detailed analyses of the fatty acid compositions of these resources and of the animals feeding on them. This was done both before and after the growth experiments in order to gain a better understanding of *S. vetulus*' fatty acid metabolism and to detect those which are potential biomarkers of trophic relationships between *S. vetulus* and its food sources.

Method

Food sources

The three prey protists were obtained from the CCAP culture collection available in the catalogue. *Cr. ovata* (9–16 mm) (CCAP 979/61) was cultivated in an inorganic Synura medium modified from Provasoli & Pinter (1960) (the earth extract was sampled in a basaltic area). *P. vestita* (8.5 mm) (CCAP 935/14) was grown in the same medium enriched with milk powder, (0.8 g/l) and *Cy. glaucoma* (10–18 mm) (CCAP 1616/1) in Cerophylle medium (90 % spring water, 10 % cereal leaves extract from Sigma) enriched with milk powder (0.8 g/l). These cultures were semicontinuous cultures with renewal of 20 to 40 % of the medium every other day in order to maintain an exponential growth state of the cultures. They were incubated at 20 °C under a photoperiod of 12 : 12 h light : dark. Particulate organic matter (POM) was collected within submerged macrophytes in backwaters of the river Allier (Auvergne, France). POM consisted of flocculent brown coloured material, containing amorphous detrital particles, some filamentous Chlorophyceae, large quantities of live diatoms and a few ciliates.

Zooplankton

S. vetulus was isolated from zooplankton samples collected in backwaters of the river Allier and cultured in spring water, and fed every other day with a 50/50 mixture of freeze-dried fish foods (Tetramin[®] + Tetraphyll[®]) broken down into fine particles by ultrasound.

Growth experiment

Each growth experiment was conducted in triplicate using the following protocol: 3–50 newly-hatched *S. vetulus* (<12 hours old) were isolated in the culture medium and were placed in three small glass beakers (50 neonates in each tank) filled with 600 ml of spring water which was renewed every other day. The glass tanks were placed in a temperature-controlled chamber (20 °C) with a 12 : 12 h light : dark cycle. The newly-hatched cladocerans were given the artificial freeze-dried diet for 4 days, and grew to a size at which they could capture particles of a similar size to the prey micro-organisms. The animals were then fed every day for 6 days with the test prey protists. The cultured protists were concentrated by centrifugation and washed by suspension in sterile mineral water. The biomass of the prey protists supplied was adjusted so as to offer approximately the same quantity of food (Table 1). The collected particulate organic matter was freeze-dried and supplied as food for *S. vetulus* following the same protocol as for freeze-dried food. The amount of POM was adjusted as close as possible to the distributed protists' biomass.

We investigated the timing of the appearance of the clutches every day. At the end of the experiment, the number of survivors, their length, the number of eggs and egg stages were recorded. The lipid content of the survivors was then analysed.

Lipid analysis

Lipids were extracted using the method of Folch et al. (1957). Fatty acids (FA) analyses were performed on total lipids (TL) extracted from protists and POM and on neutral lipids (NL) and phospholipids (PL) from *S. vetulus*. The lipid classes of the cladocerans were separated by Thin Layer Chromatography on silica gel plates, with hexane/diethyl ether/methanol/acetic acid (90 : 20 : 3 : 2 V/V) (Desvillettes et al. 1994). Lipid classes were identified by comparison with commercial standards purchased from Sigma. Acyl-Glycerols (mainly triacylglycerols and diacylglycerols) were

Table 1. Amount of food offered to *Simocephalus vetulus* in each feeding experiment.

Treatment	Food	Days exposed	Concentration		
			cells/ml	mg C/l	mg dry weight/l
Initial artificial diet	freeze-dried food	1–4	–	–	2.0
A	<i>Cryptomonas</i>	5–10	$1 \cdot 10^4$	1.4	2.7
B	POM	5–10	–	–	2.5
C	<i>Paraphysomonas</i>	5–10	$1.8 \cdot 10^4$	1.2	2.5
D	<i>Cyclidium</i>	5–10	$8 \cdot 10^3$	1.4	2.9

grouped together with free fatty acids and sterols esters in order to constitute the neutral lipids. Fatty acid methyl esters (FAMES) from zooplankton lipids and total lipids of the test foods were prepared by hydrolysis and methylation. The lipid extract was maintained at 90 °C for 40 min in sealed tubes containing hexane and 2 N methanolic sodium hydroxide. The tubes were then cooled and 2 N methanolic sulfuric acid was added. After 20 min at 90 °C and a short centrifugation, the supernatant was transferred to another tube and dried under nitrogen and the FAMES stored at -40 °C in hexane. FAMES were analysed on a Chrompack CP 9001 gas chromatograph connected to a recording integrator. The GC was equipped with a capillary column (Chrompack CP 7747: 25 m × 0.32 mm i.d., film thickness: 0.20 µm) coated with FFAP phase. The oven temperature was programmed to increase from 160 °C to 240 °C at a rate of 2.5 °C per min. We used a split-splitless injection system with helium as carrier gas. FAMES were identified by comparison with known laboratory standards and commercial standards from Sigma and Supelco. The concentration of total FAs was estimated using two free fatty acids as internal standards (13:0 and 23:0) which do not interfere with the major FAME peaks. Internal standards were added before derivatisation. Fatty acids compositions of all the samples are means of triplicates (3 independent extractions and derivatisations).

Statistical analysis

The survival rate, the fecundity and the length of the cladocerans at the end of each experiment were compared two-by-two by one-way ANOVA (Scheffé Test) ($p < 0.05$). Before proceeding to this ANOVA, normality distribution of data and homogeneity of variances were checked by using a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test (Sokal & Rohlf 1995).

Results

Survival, growth and reproduction of the cladocerans

The survival, growth and reproduction of *S. vetulus* varied greatly depending on the food supplied (Table 2). The values differed significantly from one an-

Table 2. Survival rates, size and fecundity of the cladocerans *Simocephalus vetulus* recorded at the end of each experiment. Results are means ± SD. Offspring indicates the day of the neonates occurrence in the tanks. All the values differed significantly from one another except those which are italicized ($p < 0.05$, Scheffé test). Those italicized values are both similar ($p > 0.05$, Scheffé test).

Experiment	Survival (%)	Size (mm)	Fecundity [(eggs + neonates)/female]	Offspring (day)
A (<i>Cryptomonas</i>)	82 ± 7.9	1734 ± 119	12 ± 2.1	8
B (POM)	91 ± 0.5	1588 ± 118	5.6 ± 3.5	10
C (<i>Paraphysomonas</i>)	40 ± 3.1	1369 ± 72	0.6 ± 0.8	–
D (<i>Cyclidium</i>)	68 ± 7.2	1568 ± 112	5.5 ± 3.0	10

other (one-way analysis of variance, $p < 0.05$) except for *Cr. ovata* and *Cy. glaucoma* for survival and *Cy. glaucoma* and POM for size and fecundity. The animals fed *Cr. ovata* had a survival of 82 %, showed the greatest increase in size and had the highest fecundity. Animals fed *Cr. ovata* also had offspring which hatched earlier. The *S. vetulus* fed on *Cy. glaucoma* and POM had similar fecundities of 5.5 and 5.6, respectively. Offspring only appeared on the 10th and final day of the experiments. However, the cladocerans fed POM had the highest survival. In contrast, cladocerans fed on *P. vestita* had high mortality and a small increase in size. Their fecundity was nearly zero and their eggs did not hatch by the end of the experiment.

Fatty acid compositions

Freeze dried food offered to *S. vetulus* as a pre-feeding treatment was characterized by a high concentration of PUFA (35.0 %) curiously dominated by 18:2(n-6). Among the (n-3) series, 18:3(n-3), 20:5(n-3) and 22:6(n-3) were roughly present in the range of 2.2 %–2.9 %. The other predominant fatty acids were saturated forms (16:0 and 18:0) and monounsaturated forms such as 18:1(n-9) and 16:1(n-7) (Table 3).

The fatty acid composition of *Cr. ovata* was characterized by a high percentage (76.3 %), and clear dominance of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of the (n-3) series especially 18:3(n-3), 18:4(n-3) and 20:5(n-3) (Table 3). 16:0 was also an important contributor to *Cr. ovata* fatty acid profiles (11.9 %).

The obligate heterotrophic flagellate *P. vestita* exhibited a totally different fatty acid composition as PUFA were only present in very small percentages (4.5 %). The only notable PUFA was 18:2(n-6) accounting for 1.7 % and, therefore, the dominant FA were 16:0, 16:1(n-7), 18:1(n-9), 18:1(n-7) as well as branched uneven numbered fatty acids (iso and anteiso 15:0 and 17:0).

Total lipids of *Cy. glaucoma* contained high levels of saturated fatty acids and monounsaturated fatty acids, mainly dominated by 16:0, 18:0 and isomers of 18:1. However this ciliate had larger proportions of PUFA than *P. vestita* and the major components of its PUFA were 18:2(n-6), 18:3(n-6) and 20:4(n-3).

Particulate organic matter was also characterized by high levels of mono-unsaturated and saturated components. Also notable in the POM total lipids was the presence of branched uneven fatty acids (11.0 %) typical of bacterial fatty acids. The amount of PUFA was low in POM (7.1 %), although the content of (n-3)- and of (n-6)-series were similar. The only long chain (20 carbon atoms) PUFA was 20:5(n-3).

Neutral lipids (NL) of *S. vetulus* at the end of the pre-feeding stage contained larger percentages of saturated fatty acids than of polyunsaturated ones

Table 3. Fatty acid composition (wt. %) of initial freeze-dried food and tested food total lipids. Means (n = 3) \pm SD. POM, particulate organic matter; S branched, iso 15:0 + ante 15:0 + iso 17:0 + ante 17:0; S (n-3), total (n-3) PUFA; S (n-6), total (n-6) PUFA; tr, indicates traces <0.1 %.

Fatty acids	freeze-dried food	<i>Cryptomonas</i>	POM	<i>Para-physomonas</i>	<i>Cyclidium</i>
12:0	0.1 \pm 0.0	tr –	1.0 \pm 0.2	1.7 \pm 0.6	1.4 \pm 0.6
14:0	3.0 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1	5.2 \pm 1.7	8.3 \pm 0.8	8.3 \pm 2.8
15:0	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	2.3 \pm 0.9	1.2 \pm 0.0	1.3 \pm 0.3
16:0	18.6 \pm 0.2	11.9 \pm 1.9	13.5 \pm 8.4	34.6 \pm 3.1	36.9 \pm 2.6
17:0	0.4 \pm 0.0	1.6 \pm 0.3	1.7 \pm 1.1	1.2 \pm 0.2	0.7 \pm 0.1
18:0	6.8 \pm 0.0	1.5 \pm 0.2	8.6 \pm 1.6	7.2 \pm 0.6	14.4 \pm 4.6
20:0	2.4 \pm 0.1	– –	1.2 \pm 0.9	tr –	0.8 \pm 0.3
22:0	1.8 \pm 0.3	– –	1.6 \pm 1.3	0.2 \pm 0.1	– –
24:0	0.6 \pm 0.0	– –	3.3 \pm 0.4	0.7 \pm 0.9	– –
S branched	– –	– –	11.0 \pm 4.4	5.4 \pm 3.0	3.9 \pm 0.9
14:1	– –	1.9 \pm 0.6	– –	– –	– –
16:1 (n-9)	– –	0.7 \pm 0.2	2.0 \pm 1.3	1.1 \pm 0.8	0.5 \pm 0.0
16:1 (n-7)	4.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	13.9 \pm 6.1	12.7 \pm 1.1	4.7 \pm 0.8
17:1 (n-7)	0.5 \pm 0.1	– –	– –	1.5 \pm 1.4	– –
18:1 (n-9)	17.8 \pm 0.2	1.4 \pm 0.3	15.9 \pm 5.4	6.1 \pm 1.2	9.7 \pm 1.4
18:1 (n-7)	2.5 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2	8.6 \pm 2.1	11.6 \pm 4.8	7.2 \pm 0.5
18:1 iso	– –	– –	– –	1.7 \pm 1.4	0.9 \pm 0.1
20:1 (n-11)	– –	– –	1.0 \pm 0.7	– –	– –
20:1 (n-9)	3.1 \pm 0.0	0.6 \pm 0.0	0.8 \pm 0.5	– –	0.4 \pm 0.6
22:1 (n-9)	2.4 \pm 0.3	– –	– –	– –	– –
			–	0.2	
16:2 (n-4)	– –	– –	1.4 \pm 0.7	– –	– –
18:2 (n-6)	25.6 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	3.3 \pm 1.2	1.7 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2
18:3 (n-6)	– –	– –	– –	0.6 \pm 0.7	1.7 \pm 0.1
18:3 (n-3)	2.8 \pm 0.0	28.3 \pm 2.0	2.1 \pm 0.6	1.0 \pm 1.2	0.8 \pm 0.2
18:4 (n-3)	0.5 \pm 0.0	24.0 \pm 1.8	tr –	tr –	0.8 \pm 0.2
20:2 (n-6)	0.2 \pm 0.0	0.7 \pm 0.0	– –	– –	– –
20:3 (n-6)	– –	– –	– –	– –	0.2 \pm 0.3
20:4 (n-6)	– –	– –	tr –	0.6 \pm 0.7	– –
20:3 (n-3)	– –	tr –	– –	0.2 \pm 0.2	– –
20:4 (n-3)	– –	1.9 \pm 0.1	– –	– –	1.1 \pm 0.3
20:5 (n-3)	2.2 \pm 0.0	17.4 \pm 1.0	1.7 \pm 0.7	– –	0.7 \pm 0.1
22:2 (n-6)	0.8 \pm 0.0	– –	tr –	0.5 \pm 0.6	0.6 \pm 0.5
22:4 (n-3)	– –	2.4 \pm 0.5	– –	– –	– –
22:6 (n-3)	2.9 \pm 0.2	2.3 \pm 0.5	– –	– –	– –
S (n-3)	8.43	76.30	3.76	1.14	3.49
S (n-6)	26.58	1.80	3.35	3.34	5.11
(n-3)/(n-6)	0.32	42.39	1.12	0.34	0.68

Table 4. Fatty acid composition (wt. %) of neutral lipids extracted from *Simocephalus vetulus* fed freeze-dried food, *Cryptomonas*, Particulate Organic Matter, *Paraphysomonas* and *Cyclidium*. Means ($n = 3$) \pm SD. POM, particulate organic matter; S branched, iso 15:0 + ante 15:0 + iso 17:0 + ante 17:0; S (n-3), total (n-3) PUFA; S (n-6), total (n-6) PUFA; tr, indicates traces <0.1 %.

Fatty acids	<i>S. vetulus</i> fed on Freeze-dried food	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Cryptomonas</i>	<i>S. vetulus</i> fed on POM	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Paraphysomonas</i>	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Cyclidium</i>
12:0	3.3 \pm 0.4	1.8 \pm 0.8	3.2 \pm 1.0	5.5 \pm 2.2	3.4 \pm 0.7
14:0	10.3 \pm 1.2	7.0 \pm 3.5	7.3 \pm 0.5	7.9 \pm 0.1	10.5 \pm 3.4
15:0	1.9 \pm 0.0	1.4 \pm 0.6	3.5 \pm 0.1	2.1 \pm 0.3	2.3 \pm 0.7
16:0	20.6 \pm 2.1	36.3 \pm 6.2	29.5 \pm 5.0	21.1 \pm 1.8	22.6 \pm 3.4
17:0	5.6 \pm 0.4	1.4 \pm 0.4	5.8 \pm 0.5	6.6 \pm 0.1	1.1 \pm 0.6
18:0	18.0 \pm 2.9	15.3 \pm 1.9	7.1 \pm 0.3	14.5 \pm 2.0	10.6 \pm 0.3
20:0	–	0.8 \pm 0.5	0.4 \pm 0.4	1.5 \pm 1.9	2.7 \pm 0.9
22:0	0.5 \pm 0.2	1.2 \pm 2.0	–	–	–
S branched	2.1 \pm 0.7	–	10.4 \pm 0.3	7.3 \pm 0.9	7.1 \pm 3.7
14:1	3.1 \pm 0.6	0.9 \pm 0.1	–	–	–
16:1 (n-9)	–	–	2.7 \pm 0.9	0.5 \pm 0.6	–
16:1 (n-7)	2.0 \pm 0.7	2.4 \pm 1.1	3.7 \pm 1.9	4.2 \pm 1.0	4.6 \pm 0.5
17:1 (n-7)	–	–	–	–	–
18:1 (n-9)	12.4 \pm 1.1	12.3 \pm 5.7	6.4 \pm 0.4	5.0 \pm 0.7	7.1 \pm 0.1
18:1 (n-7)	2.9 \pm 0.1	1.4 \pm 1.1	0.8 \pm 0.0	5.0 \pm 3.8	2.5 \pm 0.4
16:2 (n-4)	–	–	4.8 \pm 0.2	–	–
18:2 (n-6)	2.5 \pm 0.0	0.9 \pm 0.3	1.8 \pm 0.4	1.5 \pm 0.1	1.4 \pm 1.1
18:3 (n-6)	1.8 \pm 0.3	–	5.4 \pm 1.1	0.6 \pm 0.0	1.3 \pm 0.7
18:3 (n-3)	–	5.6 \pm 6.8	tr	0.2 \pm 0.2	tr
18:4 (n-3)	7.1 \pm 0.3	4.7 \pm 1.9	1.1 \pm 0.1	7.9 \pm 1.0	9.7 \pm 5.8
20:2 (n-6)	2.7 \pm 0.1	0.7 \pm 1.0	–	1.1 \pm 1.4	–
20:3 (n-3)	–	0.6 \pm 1.0	–	1.2 \pm 1.2	–
20:4 (n-3)	–	0.5 \pm 0.8	–	–	6.1 \pm 0.4
20:5 (n-3)	0.6 \pm 0.2	3.3 \pm 1.9	1.4 \pm 0.8	2.7 \pm 0.1	2.0 \pm 1.5
22:2 (n-6)	2.5 \pm 0.1	–	4.7 \pm 0.6	3.8 \pm 1.9	4.9 \pm 6.7
22:6 (n-3)	–	1.4 \pm 0.3	–	–	–
S (n-3)	7.7	16.1	2.5	11.9	17.7
S (n-6)	9.4	1.6	11.9	7.0	7.6
(n-3)/(n-6)	0.8	9.9	0.2	1.7	2.3

(Table 4). However, these later compounds were dominated by 18:4(n-3) (7.1%), the only detected fatty acid with 18 carbon atoms belonging to the (n-3)-family. Other dominant PUFA were of the (n-6)-series: 18:2(n-6), 20:2(n-6), 22:2(n-6) occurring in NL at similar percentages (2.5 % to 2.7 %). After six days of experiment, feeding treatment induced notable differences in NL fatty acids of *S. vetulus* (Table 4). When fed *Cr. ovata*, *S. vetulus* exhibited a neutral lipid fraction containing PUFA that reflected the pattern observed in *Cr. ovata*,

i.e. a high level of 18:3(n-3), 18:4(n-3), 20:5(n-3) and to a lesser extent 22:6(n-3). In contrast, *S. vetulus* fed POM contained more PUFA of (n-6) series (11.9 %) than PUFA of (n-3) series (2.5 %) in its neutral lipids. This was particularly true for 18:3(n-6) and 22:2(n-6). Moreover, a diatom-specific fatty acids (16:2 n-4) and bacteria-specific fatty acid (branched FA), which can be used as biomarkers, were detected in substantial percentages (4.8 % and

Table 5. Fatty acid composition (wt. %) of phospholipids extracted from *Simocephalus vetulus* fed freeze-dried food, *Cryptomonas*, Particulate Organic Matter, *Paraphysomonas* and *Cyclidium*. Means (n = 3) \pm SD. POM, particulate organic matter; S branched, iso 15:0 + ante 15:0 + iso 17:0 + ante 17:0; S (n-3), total (n-3) PUFA; S (n-6), total (n-6) PUFA; tr, indicates traces <0.1 %.

Fatty acids	<i>S. vetulus</i> fed on Freeze-dried food	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Cryptomonas</i>	<i>S. vetulus</i> fed on POM	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Paraphysomonas</i>	<i>S. vetulus</i> fed on <i>Cyclidium</i>
12:0	1.4 \pm 0.3	0.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.7	1.4 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3
14:0	11.1 \pm 0.4	1.9 \pm 0.9	2.5 \pm 0.2	8.6 \pm 3.3	9.4 \pm 2.3
15:0	1.9 \pm 0.1	0.6 \pm 0.5	—	0.8 \pm 0.2	2.0 \pm 0.5
16:0	17.0 \pm 1.1	19.5 \pm 2.1	16.9 \pm 1.6	22.9 \pm 4.6	25.0 \pm 6.4
17:0	1.5 \pm 0.8	2.6 \pm 1.5	6.1 \pm 3.3	1.0 \pm 0.8	0.4 \pm 0.2
18:0	8.7 \pm 0.2	10.9 \pm 0.1	9.8 \pm 3.3	10.0 \pm 2.3	12.9 \pm 3.4
22:0	1.6 \pm 0.2	—	—	—	0.4 \pm —
24:0	1.1 \pm 1.0	1.4 \pm 1.3	1.0 \pm 1.2	3.6 \pm 1.6	1.5 \pm 0.7
S branched	2.3 \pm 0.1	—	1.7 \pm 1.5	1.9 \pm 0.5	1.3 \pm 0.3
14:1	0.3 \pm 0.3	0.7 \pm 0.6	0.4 \pm 0.4	0.3 \pm 0.2	—
16:1 (n-9)	2.1 \pm 0.8	0.8 \pm 0.7	0.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.9	—
16:1 (n-7)	6.5 \pm 0.5	3.1 \pm 2.0	9.2 \pm 1.8	5.2 \pm 2.8	7.3 \pm 0.7
17:1 (n-7)	—	—	—	—	—
18:1 (n-9)	12.3 \pm 1.6	8.1 \pm 1.7	7.4 \pm 2.8	6.4 \pm 1.3	15.8 \pm 4.8
18:1 (n-7)	6.4 \pm 1.4	6.1 \pm 1.3	9.4 \pm 4.9	6.9 \pm 3.0	2.5 \pm 3.0
16:2 (n-4)	—	—	0.6 \pm 0.6	—	—
18:2 (n-6)	6.7 \pm 1.3	2.1 \pm 1.1	11.5 \pm 3.1	0.9 \pm 0.6	0.4 \pm 1.7
18:3 (n-6)	1.2 \pm 0.5	—	4.5 \pm 1.1	0.9 \pm 0.9	0.4 \pm 0.2
18:3 (n-3)	1.0 \pm 0.3	6.5 \pm 1.6	—	1.5 \pm 0.4	0.4 \pm 0.1
18:4 (n-3)	5.1 \pm 0.7	10.3 \pm 0.7	9.6 \pm 5.5	15.9 \pm 5.8	9.6 \pm 4.7
20:2 (n-6)	1.6 \pm 0.9	—	0.9 \pm 1.1	4.3 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3
20:3 (n-6)	—	—	0.9 \pm 1.1	2.0 \pm 1.7	—
20:4 (n-6)	4.6 \pm 1.2	0.9 \pm 0.8	1.7 \pm 0.4	—	—
20:3 (n-3)	—	7.4 \pm 4.9	—	—	—
20:4 (n-3)	—	10.2 \pm 5.2	—	—	—

10.4 %, respectively) in neutral lipid fatty acids profiles. Neutral lipids of *S. vetulus* fed *P. vestita* or *Cy. glaucoma*, showed a similar specific retention of branched fatty acids (Table 4). Interestingly, with the protozoa diet, NL PUFA showed high levels of (n-3) compounds although these fatty acids were deficient in both food sources, especially in *P. vestita*. 18:4(n-3) was the major PUFA together with 22:2(n-6), 20:5(n-3) and 20:4(n-3). This last PUFA was only detected in significant amounts in *S. vetulus* fed *Cy. glaucoma* (Table 4).

In Table 5, we present fatty acid profiles of phospholipids extracted from *S. vetulus*. After the pre-feeding stage, phospholipids exhibited a higher level of PUFA than neutral lipids which is a normal trend in Cladocera (Desvillettes et al. 1994). The pattern of PUFA composition with regard to (n-6) and (n-3) acids was similar. At the end of the growth experiment (day 10), fatty acid composition of pre-fed *S. vetulus* and adult females fed on each diet differed greatly (Table 5). Furthermore, GC analysis revealed important differences between each fatty acid profile of *S. vetulus* phospholipids. For instance, phospholipids from the animals fed on *Cr. ovata* contained the highest percentages of PUFA, mainly 18:3(n-3) (6.5 %), 18:4(n-3) (10.3 %), 20:3(n-3) (7.4 %) and 20:5(n-3) (10.2 %). On the contrary, a diet such as *P. vestita* induced a marked decrease in the amount of long chain (n-3) PUFA such as 20:5(n-3) and 22:6(n-3) compensated by an increase of 18:4(n-3) (15.9 %) and elevated percentages of (n-6) PUFAs (Table 5). 18:4(n-3) was also present in substantial amounts in phospholipids of *S. vetulus* fed POM and the ciliate *Cy. glaucoma*, while 20:5(n-3) occurred in low percentages. Lastly, when fed *Cy. glaucoma* as a food source, *S. vetulus* phospholipids were characterized by high percentages of 18:2(n-6) and 18:3(n-6), which was not true for the other test diets.

Discussion

In each feeding experiment (Table 1), *S. vetulus* received a quantity of food exceeding 1 mg C/l. Lampert (1978) observed that for *Daphnia longispina*, the highest egg production was reached at 0.7 mg C/l. Although egg number and size in Daphnidae are not only linked with food availability (Glazier 1998), the food concentration in all trials did not appear to limit *S. vetulus* development. The differences observed in terms of survival, growth and reproduction (Table 2) are therefore mainly related to differences in food quality of the different food types. *S. vetulus* fed with *Cr. ovata* had the highest fecundity and had an earlier primiparous instar (Table 2). Moreover the size increase for surviving animals (between day 5 and day 10) was also higher for the animals fed *Cr. ovata*. Among the tested diets, this autotrophic flagellate is undoubtedly the most suitable food source. This is not surprising, as several species of cladocerans but also calanoids such as *Eudiaptomus gracilis* are known to obtain

high growth rates and fecundity when feeding on cryptomonads (Ahlgren et al. 1990, Weers et al. 1997, Von Elert & Stampf 2000). In contrast, the absence of reproduction after ten days and the low survival rate of the cladocerans fed *P. vestita* show that this heterotrophic flagellate is an unsuitable food resource for *S. vetulus*. *Cy. glaucoma* and freeze dried POM sustained intermediate growth and fecundity rates for *S. vetulus*. These differences in the feeding suitability could first be attributed to the ingestibility and digestibility of the tested food. It is well known that the morphological properties of microalgae, such as size, colony formation and a mucilaginous cell sheathing or spines can affect their catchability, ingestibility and digestibility (Hansen et al. 1997). On the other hand, amorphous aggregates of particulate matter in aquatic environments often contain mucoid materials that may induce inefficient grazing by zooplankton (Malej & Harris 1993). In our study, this could have been the case if POM had not been freeze dried. The freeze drying step likely eliminates the gelatinous properties of our POM leading to a more easy ingestion of this food by *S. vetulus* as was visually observed during this study (unpublished data). On the other hand, this could constitute a bias compared with what actually occurs in the natural environment. In contrast with POM, the tested protists differed in their ability to move with the aid of flagellae or ciliae. Obviously, this catchability factor does not concern *Cr. ovata*, and according to Boersma (2000), even when nutrient limited, this flagellate has little effect on the intensity of Daphnidae uptake. Similarly, none of these ingestibility/digestibility effects was shown to operate for *Paraphysomonas* species (Sanders et al. 1996). The sizes of *Cy. glaucoma*, (10–18 µm) and *Cr. ovata* (9–16 µm) were very similar and other experiments (unpublished data) tend to show that *Cy. glaucoma* can be easily ingested by young daphnids. Thus, the biochemical composition of the different foods tested seems to be the main factor determining their nutritional value for *S. vetulus*.

In our experiment, growth and fecundity of *S. vetulus* seemed to be correlated (Table 6) with the percentage of diet PUFA belonging to the (n-3)-series and especially 20 : 5(n-3). We do not know if differences in amino acid composition between the tested food sources occurred and if they had an influence

Table 6. Effects of the 20 : 5 (n-3) FA, sum of (n-3)-acids and sum of (n-3) + (n-6)-acids of the tested food on survival, size and fecundity of *Simocephalus vetulus* measured as Pearson's correlation coefficients ($n = 12$; $p < 0.01$; $r_{0.01} = 0.708$).

Variable	Survival	Size	Fecundity
20 : 5 (n-3)	0.442	0.790*	0.900*
S (n-3)	0.375	0.767*	0.878*
S (n-3) + S (n-6)	0.377	0.778*	0.884*

* Indicates significant correlation.

on *S. vetulus* development. In calanoids species, poor growth and fecundity cannot be explained by different amino acid compositions of the ingested autotrophic and heterotrophic flagellate (Klein Breteler et al. 1999). Moreover, amino acid compositions of these flagellates are often quite similar (Brown et al. 1997). But with Daphnidae a shortage in the amount of dietary lysine could cause a reduction in the metabolism of saturated fatty acids, as lysine is a precursor of carnitine (Boersma & Stelzer 2000). Therefore, possible interactions between fatty acid composition of food and certain amino acids are not to be neglected in ascertaining the energetic value of food for cladocerans, but in this study, PUFA content of the different food sources might be the main factor determining their nutritional quality for *S. vetulus*. PUFA, especially long chain compounds such as 20:5(n-3) (EPA) and 22:6(n-3) (DHA), are involved in a wide range of metabolic processes in invertebrates (D'Abramo 1979, Weber 1989, Blomquist et al. 1991) and evidence has been presented that they regulate growth of zooplankton (Brett & Müller-Navarra 1997). D'Abramo (1979) suggested that absence or low concentrations of EPA may affect clutch size and rate of reproduction in the cladoceran *Moina*. More recently, Müller-Navarra et al. (2000) have shown that the growth rate and fecundity of *Daphnia* were also correlated with the EPA content of the seston. This fatty acid occurs in the highest proportions in the *Cr. ovata* prey (17.4%). Cryptomonads are known to contain high levels of EPA as well as 18:3(n-3) and 18:4(n-3) (Ahlgren et al. 1990, Sargent et al. 1995), which provide a high nutritional value for zooplankton and likely explain the good development of *S. vetulus* fed with this high quality food.

On the other hand, PUFA compositions of protozoans have attracted less attention (Desvillettes et al. 1997). Investigations have revealed that lipid composition of ciliates resembles that of their food, i.e. ciliates lack (n-3) PUFA if they are bacterivore, and show similar PUFA patterns as in the ingested algae if they were algivore (Claustre et al. 1989, Desvillettes et al. 1997, Harvey et al. 1997). Heterotrophic nanoflagellates such as *Bodo*, are dominated by (n-6) PUFA when produced in batch cultures (Zhukova & Kharlamenko 1999). Our study on *Cy. glaucoma* and *P. vestita* is in good agreement with these reports. Both protozoa PUFA are dominated by compounds of (n-6) series but *Cy. glaucoma* had slightly higher quantities of (n-3) PUFA than *P. vestita*, especially of 20:5(n-3), which was absent from the flagellate. Therefore, the lack of EPA in *P. vestita* could explain why *S. vetulus* did not develop with this heterotrophic flagellate as food, and also the low amount of EPA detected in *Cy. glaucoma*, probably induced a more limited growth and fecundity than that observed with *Cr. ovata*. The same is true for the cladocerans fed POM which was richer in EPA than *Cy. glaucoma*. The fatty acid composition of POM resembled that of its dominant attached organisms, i.e. diatoms with 16:2(n-4) and 20:5(n-3), bacteria with branched fatty acids and

protozoans with 18:2(n-6) and 18:3(n-6). Najdek (1996) made similar observations in a study relating to marine amorphous aggregates. These markers were detected in substantial levels in the neutral lipids of *S. vetulus* fed POM and also, with regard to branched fatty acids, in *S. vetulus* fed *Cy. glaucoma* and *P. vestita*. These branched fatty acids of bacterial origin could have been transferred to *S. vetulus* by the tested protozoans or by direct ingestion of bacteria developing in cultures since these fatty acids are often detected in bacterivore protozoans (Harvey et al. 1997) and can be accumulated in microcrustacea (Ederington et al. 1995, Desvillettes et al. 1997).

One of the outstanding results of this experiment was the rapid change that occurred in the fatty acid compositions of neutral lipids and phospholipids of *S. vetulus* as a result of the different food sources. This is particularly relevant for PUFA of the (n-3) and (n-6) series (Figs. 1 and 2). Several changes observed in the proportions of certain PUFA between young *S. vetulus* (at the end of the pre-feeding step) and the surviving adults cannot be explained only by nutritional inputs. Hence, with each tested food, 18:4(n-3) was detected in very high proportions in *S. vetulus* neutral lipids or phospholipids whereas this PUFA was lacking from POM and *P. vestita*. Moreover, 18:3(n-3) which was provided by all the food sources was not accumulated in the lipids of *S. vetulus* fed on POM, *P. vestita* and *Cy. glaucoma*. In the same way, intermediate compounds of the biosynthesis of 20:5(n-3) and 20:4(n-6) were also observed in the Cladocera while they were absent in the diet. These were 20:3(n-3) in *S. vetulus* fed *Cr. ovata* and PUFAs of (n-6) series with 20 or 22 carbon atoms detected in *S. vetulus* in the other trials. These results revealed a certain capacity of PUFA conversion by *S. vetulus*, which goes with its growth and biomembranes elaboration throughout the survey. It is noteworthy that the highest amount of 18:4(n-3) and (n-6) PUFA are found in cladocerans fed low EPA food (*Cy. glaucoma*, POM) or on EPA deprived *P. vestita*. Therefore, this bioconversion activity probably partially compensates for the negative impact of insufficient dietary EPA availability. The labelling of Daphnidae with ^{14}C linoleic acid and ^{14}C linolenic acid has shown that these crustaceans do convert small amounts of these fatty acids into 20 carbon chain PUFA (Weers et al. 1997). This conversion is, however, low or inefficient and planktonic Daphnidae grow better if EPA or DHA are provided with food (Brett & Müller-Navarra 1997, DeMott & Müller-Navarra 1997). In many animals (mammals, fishes), it is accepted that EPA is synthesized from dietary 18:3(n-3) via a pathway requiring the sequential use of position-specific D6 and D5 desaturases which also metabolize 18:2(n-6) into 20:4(n-6). The detailed study of *S. vetulus* PUFA (Figs. 1 and 2) reveals that the first part of the process occurred in this Cladocera. Dietary 18:3(n-3) seems to be largely desaturated by an efficient D6 desaturase into 18:4(n-3). This intermediary product accumulated in *S. vetulus* probably because the second step of the pathway

was less efficient for producing 20:4(n-3) by elongation and converting it into 20:5(n-3) via D5 desaturase. Furthermore, the very low percentages of 20:4(n-6) detected in *S. vetulus* as well as the elongated product formed from 18:2(n-6) and 18:3(n-6), such as 20:2(n-6), 20:3(n-6) and 22:2(n-6) seem to confirm the low efficiency of the D5 desaturase in *S. vetulus*. Nevertheless, it is difficult to demonstrate this unequivocally as this analysis is complicated by the differences in the dietary inputs between the tested diets and the differences in turnover rates of fatty acids from structural lipids and neutral lipids observed among the cladocerans (Figs. 1 and 2).

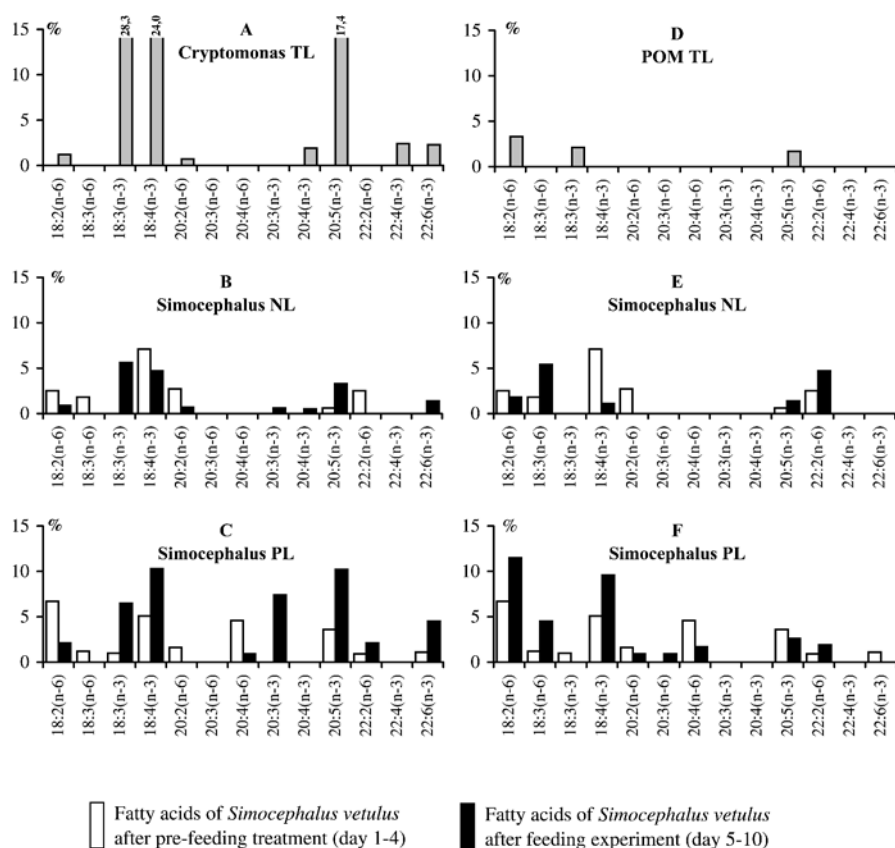


Fig. 1. Polyunsaturated fatty acid (PUFA) profiles of food sources and *Simocephalus vetulus* after pre-feeding step and feeding treatment. PUFA-profiles from (A) total lipids of the food *Cryptomonas ovata*, (B) neutral lipids and (C) phospholipids extracted from *Simocephalus vetulus* feeding on *Cr. ovata*. PUFA-profiles from (D) total lipids of the food POM, (E) neutral lipids and (F) phospholipids extracted from *Simocephalus vetulus* feeding on POM. Values are given as wt.% and are means of three replicates.

It is known from previous experiments that fatty acid synthesis in planktonic Daphnidae is usually low, and that 98 % of the body lipids originate from the diet (Goulden & Place 1990). Thus, it seems that *S. vetulus* has high abilities for de novo fatty acid synthesis. There may be differences between the different zooplankton species as to their fatty acid metabolism. For instance, during a labelling study, Farkas et al. (1981) recovered substantial levels of radioactivity in 20:5(n-3) from *Daphnia magna* while this was not observed to such an extent with *Daphnia galeata* (Weers et al. 1997). According to Nanton & Castell (1998) it seems that harpacticoid copepods, which characteristically inhabit detritus-rich environments where food is deficient in

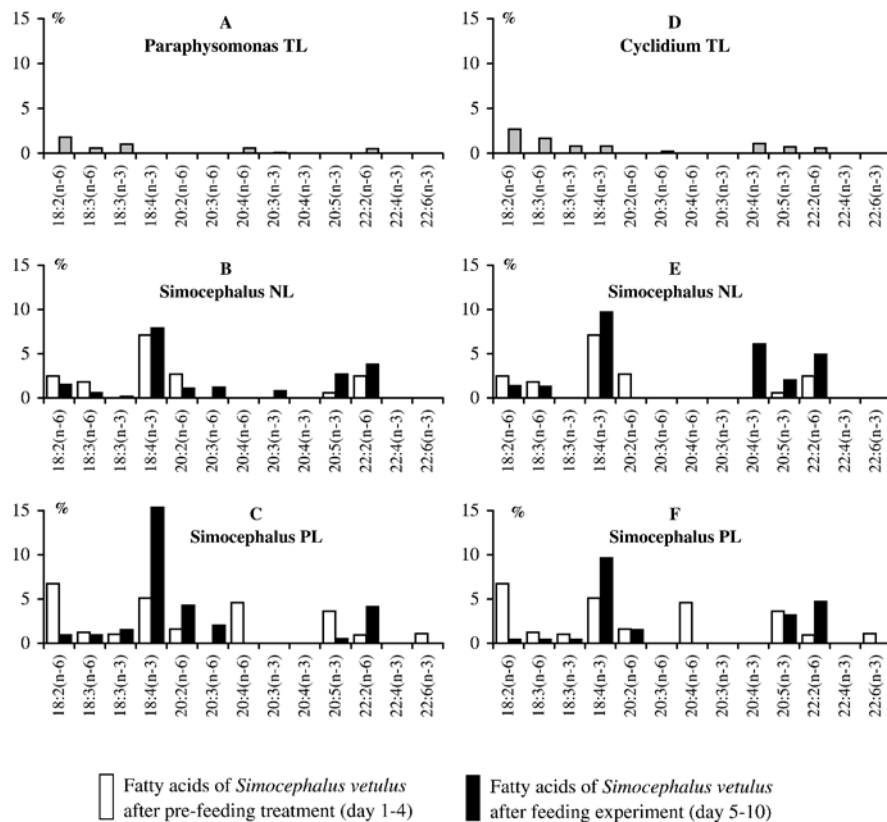


Fig. 2. Polyunsaturated fatty acid (PUFA) profiles of food sources and *Simocephalus vetulus* after pre-feeding step and feeding treatment. PUFA-profiles from (A) total lipids of the food *Paraphysomonas vestita*, (B) neutral lipids and (C) phospholipids extracted from *Simocephalus vetulus* feeding on *P. vestita*. PUFA-profiles from (D) total lipids of the food *Cyclidium glaucoma*, (E) neutral lipids and (F) phospholipids extracted from *Simocephalus vetulus* feeding on *Cy. glaucoma*. Values are given as wt.% and are means of three replicates.

essential fatty acids, possess the capability to actively synthesize these compounds in significant quantities. Moreover, Ahlgren et al. (1990) observed that *Chydorus sphaericus*, a species generally encountered in the littoral zone of lakes, exhibited better growth rates than *Daphnia longispina* when fed deficient-EPA diets. Our hypothesis is that habitat, and hence the seston particles encountered could have influenced the PUFA biosynthesis abilities of zooplankton species. Similarly, it is possible that adaptation to river backwaters led *S. vetulus* to develop a marked fatty acid synthesis ability to face periods when food is lacking adequate amounts of long chain PUFA.

Consequently, this work confirms previous observations made in the wild by Desvillettes et al. (1994) and tends to demonstrate that *S. vetulus* is able to use diverse feeding sources, even to include organic detritus. Like other Daphnidae, this benthic species grows better when fed EPA rich-cryptomonads but can develop on EPA limited-organisms. On the other hand, a complete absence of EPA in the diet results in very poor growth and survival. This study also seems to confirm Sanders & Wickham's (1993) hypothesis that certain specific fatty acids could be dependable predictors of the nutritional quality of protozoa. However, it should be noted that the fatty acid composition of heterotrophic protozoa can vary enormously, on the one hand as a function of the biosynthetic capacities peculiar to each species but above all according to the fatty acid supply of their nutritional resources (Desvillettes et al. 1997, Harvey et al. 1997, Véra et al. 2001).

References

- Ahlgren, G., Lundstedt, L., Brett, M. & Forsberg, C. (1990): Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. – *J. Plankton Res.* **12**: 809–818.
- Amoros, C. (1984): Crustacés cladocères. – Extrait du Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon **5**: 1–63.
- Amoros, C. & Chessel, D. (1985): Populations of Cladocera (Crustacea), as descriptors of the hydrological functioning of stagnant waterways. – *Annales de Limnologie* **21**: 227–240.
- Blomquist, G. J., Borgeson, C. E. & Vundla, M. (1991): Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. – *Insect Bioch.* **21**: 99–106.
- Boersma, M. (2000): The nutritional quality of P-limited algae for *Daphnia*. – *Limnol. Oceanogr.* **45**: 1157–1161.
- Boersma, M. & Stelzer, C. P. (2000): Response of a zooplankton community to the addition of unsaturated fatty acids: an enclosure study. – *Freshwat. Biol.* **45**: 179–188.
- Brett, M. T. & Müller-Navarra, D. C. (1997): The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. – *Freshwat. Biol.* **38**: 483–500.
- Brown, M., Jeffrey, S., Volkman, J. & Dunstan, G. (1997): Nutritional properties of microalgae for mariculture. – *Aquaculture, Amsterdam* **151**: 315–331.

- Claustre, H., Marty, J. C., Cassiani, L. & Dagaut, J. (1989): Fatty acid dynamics in phytoplankton and microzooplankton communities during a spring bloom in the coastal Ligurian sea: ecological implications. – *Mar. Microb. Food Webs* **3**: 51–66.
- D'Abramo, L. R. (1979): Dietary fatty acid and temperature effects on the productivity of the cladoceran, *Moina macrocopa*. – *Biol. Bull.* **157**: 234–248.
- DeMott, W. R. (1986): The role of taste in food selection by freshwater zooplankton. – *Oecologia* **69**: 334–340.
- DeMott, W. R. & Müller-Navarra, D. C. (1997): The importance of highly unsaturated fatty acids in zooplankton nutrition: evidence from experiments with *Daphnia*, a cyanobacterium and lipid emulsions. – *Freshwat. Biol.* **38**: 649–664.
- Desvillettes, C., Bourdier, G., Amblard, C. & Barth, B. (1997): Use of fatty acids for the assessment of zooplankton grazing on bacteria, protozoans and microalgae. – *Freshwat. Biol.* **38**: 629–637.
- Desvillettes, C., Bourdier, G., Breton, J. C. & Combrouze, Ph. (1994): Fatty acids as organic markers for the study of trophic relationships in littoral cladoceran communities of a pond. – *J. Plankton Res.* **16**: 643–659.
- Dole-Olivier, M.-J., Galassi, D. M. P., Marmonier, P. & Creuzé Des Chateliers, M. (2000): The biology and ecology of lotic microcrustaceans. – *Freshwat. Biol.* **44**: 63–91.
- Ederington, M. C., McManus, G. B. & Harvey, H. R. (1995): Trophic transfer of fatty acids, a triterpenoid alcohol between bacteria, a ciliate, and the copepod *Acartia tonsa*. – *Limnol. Oceanogr.* **40**: 860–867.
- Farkas, T., Kariko, K. & Csengeri, I. (1981): Incorporation of [$1\text{-}^{14}\text{C}$] acetate into fatty acids of the crustaceans *Daphnia magna* and *Cyclops strenus* in relation to temperature. – *Lipids* **16**: 418–422.
- Folch, J. M., Less, M. & Stanley, G. H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. – *J. Biol. Chem.* **226**: 497–509.
- Frey, D. G. (1987): The taxonomy and biogeography of the Cladocera. – *Hydrobiologia* **145**: 5–17.
- Glazier, D. S. (1998): Does body storage act as a food-availability cue for adaptative adjustment of egg size and number in *Daphnia magna*? – *Freshwat. Biol.* **40**: 87–92.
- Goedkoop, W., Sonesten, L., Markensten, H. & Ahlgren, G. (1998): Fatty acid biomarkers show dietary differences between dominant chironomid taxa in lake Erken. – *Freshwat. Biol.* **40**: 135–143.
- Goulden, C. E. & Place, A. R. (1990): Fatty acid synthesis and accumulation rates in Daphnids. – *Exp. Zool.* **266**: 168–178.
- Hansen, P. J., Bjornsen, P. K. & Hansen, B. W. (1997): Zooplankton grazing and growth: Scaling within the 2–2,000- μm body size range. – *Limnol. Oceanogr.* **42**: 687–704.
- Harvey, H. R., Ederington, M. C. & McManus, G. B. (1997): Lipid composition of the marine ciliates *Pleuronema* sp. and *Fabrea salina*: shifts in response to change diets. – *J. eukaryot Microbiol.* **44**: 189–193.
- Klein Breteler, W. C. M., Schogt, N., Baas, M., Schouten, S. & Kraay, G. W. (1999): Trophic upgrading of food quality by protozoans enhancing copepod growth: role of essential lipids. – *Mar. Biol.* **135**: 191–198.

- Lampert, W. (1978): A field study on the dependence of the fecundity of *Daphnia* sp. On food concentration. – *Oecologia* **36**: 363–369.
- Malej, A. & Harris, R. P. (1993): Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? – *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **96**: 33–42.
- Müller-Navarra, D. C. (1995): Evidence that a highly unsaturated fatty acid limits *Daphnia* growth in nature. – *Arch. Hydrobiol.* **132**: 297–307.
- Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Liston, A. M. & Goldman, C. R. (2000): A highly unsaturated fatty acid predicts carbon transfer between primary producers and consumers. – *Nature* **403**: 74–77.
- Najdek, M. (1996): Fatty acid composition in amorphous aggregates in the northern Adriatic Sea. – *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **139**: 219–226.
- Nanton, D. A. & Castell, J. D. (1998): The effects of dietary fatty acids on the fatty acids composition of the harpacticoid copepod, *Tisbe* sp., for use as a live food for marine fish larvae. – *Aquaculture* **163**: 251–261.
- Norsker, N. H. & Støttrup, J. G. (1994): The importance of dietary HUFAs for fecundity and HUFA content in the harpacticoid, *Thisbe holothuriae* Humes. – *Aquaculture* **125**: 155–166.
- Provasoli, L. & Pinter, I. S. (1960): Artificial media for freshwater algae. – In: Tryon, C. A. & Hartmann, R. T. (eds.): The ecology of algae, pymatunning symposia, pp. 84–86.
- Sand-Jensen, K., Jeppesen, E., Nielsen, K., Der Bijl, L., Hjermand, L., Nielsen, L. W. & Iversen, T. M. (1989): Growth of macrophytes and ecosystem consequences in a lowland Danish stream. – *Freshwat. Biol.* **22**: 15–32.
- Sanders, R. W. & Wicham, S. A. (1993): Planktonic protozoa and metazoa: predation, food quality and population control. – *Mar. Microb. Food Webs* **7**: 197–223.
- Sanders, R. W., Williamson, C. E., Stutsman, P. L., Moeller, R. E., Goulden, C. E. & Aoki-Goldsmith, R. (1996): Reproductive success of “herbivorous” zooplankton fed algal and non algal food resources. – *Limnol. Oceanogr.* **41**: 1295–1305.
- Sargent, J. R., Bell, M. V. & Henderson, R. J. (1995): Protists as source of (n-3) polyunsaturated fatty acids for vertebrate development. – *Protistological Actualities*, pp. 54–64.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1995): Biometry. The principles and practice of statistics in Biological research. 3rd ed. – W. H. Freeman and company, New York.
- Stanley-Samuelson, D. W. (1994 a): Assessing the significance of prostaglandins and other eicosanoids in insect physiology. – *J. Insect Physiol.* **40**: 3–11.
- (1994 b): The biological significance of prostaglandins and related eicosanoids in invertebrates. – *Amer. Zool.* **34**: 589–598.
- Urabe, J., Clasen, J. & Sterner, R. W. (1997): Phosphorus limitation of *Daphnia* growth: is it real? – *Limnol. Oceanogr.* **42**: 1436–1443.
- Van Donk, E., Lüring, M., Hessen, D. O. & Lokhorst, G. M. (1997): Altered cell wall morphology in nutrient-deficient phytoplankton and its impact to grazers. – *Limnol. Oceanogr.* **42**: 357–364.
- Véra, A., Desvillettes, C., Bec, A. & Bourdier, G. (2001): Fatty acid composition of freshwater heterotrophic flagellates: an experimental study. – *Aquat. Microb. Ecol.* **25**: 271–279.

- Von Elert, E. & Stampfl, P. (2000): Food quality for *Eudiaptomus gracilis*: the importance of particular highly unsaturated fatty acids. – *Freshwat. Biol.* **445**: 189–200.
- Weber, P. C. (1989): Are we what we eat? Fatty acids in nutrition and in cell membranes: cell functions and disorders induced by dietary conditions. – *Fish, fats and your health*, Svanøy Foundation, Svanøbukt Norway, pp. 9–18.
- Weers, P. M. M., Siewertsen, K. & Gulati, R. D. (1997): Is the fatty acid composition of *Daphnia galeata* determined by the fatty acid composition of the ingested diet? – *Freshwat. Biol.* **38**: 731–738.
- Zhukova, N. V. & Kharlamenko, V. I. (1999): Sources of essential fatty acids in the marine microbial loop. – *Aquat. Microb. Ecol.* **17**: 153–157.

Submitted: 11 March 2002; accepted: 14 October 2002.

Abstract

The lake La Godivelle-d'en-Haut (French Massif Central) is a mountain lake which is characterized by low temperatures and a very low primary production. In this ecosystem with restricting abiotic and biotic conditions, the zooplanktonic community is largely dominated by the calanoid copepod *Mixodiaptomus laciniatus* who, with his large lipid reserves, is active all around the year.

Therefore, our study search to know how these lipid reserves (wax esters and triacylglycerols) are accumulated and used by the different developmental stages of the copepod.

The trophic relationships between this small crustacean and the microbial communities were studied by concomitant use of pigment, fatty acid and sterol biomarkers. Our results obtained in the laboratory and *in situ* show that the copepod preferentially feed on cryptophyceae, bacillariophyceae and chlorophyceae. Nevertheless, high proportions of C15 + C17 fatty acids in the calanoid suggest that HNF and/or heterotrophic bacteria also contribute to his food. However, CV-Ad. stages accumulate the most important lipid reserves in autumn, during the high development of the chlorophyceae *Sphaerocystis*. These reserves sustain the next reproduction and are allocated to eggs to allow development of the first naupliar stages in spring. Thus, our study show the importance of the autumnal phytoplanktonic bloom and tend to suggest that *Mixodiaptomus*, by its life cycle, has developed a set of ecological, physiological and biochemical strategies to allow his durability in this ecosystem.

Key words : Life cycle, pigments, fatty acids, sterols, lipid reserves

Résumé

Le lac de La Godivelle-d'en-Haut (Massif Central français) est un lac de montagne caractérisé par de basses températures et une très faible production primaire. Dans cet écosystème où règnent des conditions abiotiques et biotiques contraignantes, la communauté zooplanctonique est dominée très nettement par le copépode calanoïde *Mixodiaptomus laciniatus* qui, grâce à des réserves lipidiques importantes, peut rester actif toute l'année.

Notre étude s'est donc attachée à préciser comment ces réserves lipidiques (cérides et triglycérides) étaient accumulées et utilisées par les différents stades de développement du copépode.

Chez *Mixodiaptomus*, l'accumulation des réserves lipidiques est largement dépendante des ressources alimentaires présentes dans le milieu, mais également de son stade de développement.

Les relations trophiques liant ce microcrustacé aux communautés microbiennes ont été étudiées par l'utilisation concomitante de marqueurs chémotaxonomiques de type pigments, acides gras et stérols. Nos résultats obtenus en milieu expérimental et *in situ* montrent que les préférences alimentaires du copépode vont vers les cryptophycées, les diatomées et les chlorophycées. Néanmoins, les fortes proportions d'AG en C15 + C17 chez le calanoïde suggèrent que les HNF et/ou les bactéries hétérotrophes contribuent également à son régime alimentaire. C'est cependant en automne, durant le fort développement de la chlorophycée *Sphaerocystis*, que les stades CV-Ad. accumulent les plus fortes quantités de lipides. Ces réserves soutiennent la prochaine reproduction et sont allouées aux œufs pour assurer le développement des premiers stades larvaires au printemps suivant. Notre étude souligne donc l'importance du bloom phytoplanctonique automnal et laisse suggérer que *Mixodiaptomus*, par son cycle de développement, a pu mettre en place un ensemble de stratégies écologiques, physiologiques et biochimiques afin d'assurer sa pérennité dans cet écosystème.

Mots-clé : Cycle biologique, pigments, acides gras, stérols, réserves lipidiques